

# **DIE BEDEUTUNG DES TRANSPORTERS SOAT (SLC10A6) FÜR DIE ENTWICKLUNG VON ESTROGEN- ABHÄNGIGEN MAMMAKARZINOMEN**

**EMRE KARAKUS**

## **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

**Die Bedeutung des Transporters SOAT (SLC10A6)  
für die Entwicklung von Estrogen-abhängigen  
Mammakarzinomen**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Emre Karakus**

Tierarzt aus Kirikkale, Türkei

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

---

Gutachter:

Prof. Dr. J. Geyer  
Prof. Dr. M. Bergmann

Tag der Disputation: 02. 07. 2009

*Der allmächtige Gott hat für jede Krankheit  
ein Heilmittel erschaffen.  
Nur gegen den Tod gibt es kein Heilmittel.*

*Prophet Mohammed*

*Tuğba und  
unserer Tochter Ravza  
in Liebe und Bewunderung gewidmet*

Erklärung nach § 10, Absatz 5 der Promotionsordnung der Justus-Liebig-Universität

Gießen:

„Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“





# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	IV
<b>Genetischer Code</b>	VI
<b>1. Einleitung</b>	1
<b>2. Literaturübersicht</b>	3
2.1 Estrogensynthese bei der Frau	3
2.2 Mammakarzinom	4
2.2.1 Allgemeine Genese	4
2.2.2 Form, Verlauf und Bedeutung des Brustkrebses	6
2.3 Intrakrinologie	8
2.3.1 Estrogenrezeptoren	10
2.3.2 Steroide sulfatase (STS)	11
2.3.3 Aromatase	12
2.3.4 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenase (17 $\beta$ HSD)	12
2.3.5 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase	13
2.4 Prinzipien des Membrantransports	14
2.5 Die Superfamilie der Solute Carrier (SLC)	18
2.5.1 Die Solute Carrier-Familie 10 (SLC10)	20
2.5.2 Der natriumabhängige Steroidsulfattransporter SOAT (SLC10A6)	21
2.6 Zelllinien T47D und MCF7	22
2.7 Mammatumore in der Veterinärmedizin (Hund und Katze)	23
<b>3. Fragestellungen</b>	25
<b>4. Material und Methoden</b>	26
4.1 Material	26
4.1.1 Chemikalien, Medien, Reagenzien, Enzyme und Kits sowie deren Bezugsquellen	26
4.1.2 Kommerziell erhältliche Kits	28
4.1.3 Radioaktiv-markierte Chemikalien	28
4.1.4 Geräte	29
4.1.5 Prokaryotische und eukaryotische Zellstämme	30
4.1.6 Enzyme	30
4.1.7 Oligonukleotide	31
4.1.8 Plasmide	31
4.2 Methoden	33

4.2.1 Molekularbiologische Methoden	34
4.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	34
4.2.1.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	35
4.2.1.3 Trennung von DNA-Fragmenten durch Gel Extraktion	35
4.2.1.4 Ligation von DNA	35
4.2.1.5 Die Herstellung chemokompetenter Bakterien (XL10Gold)	35
4.2.1.6. Die Herstellung elektrokompeter Bakterien (HB101)	36
4.2.1.7 Klonierung der Vektoren	36
4.2.1.8 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA durch Elektroporation	39
4.2.1.9 Isolieren der Kolonien und Animpfen von Kulturen	40
4.2.1.10 Einfrieren von transformierten Bakterien	41
4.2.1.11 Plasmid-Präparationen im Mini- und Midi-Maßstab	41
4.2.1.12 Ethanol-Fällung von DNA	43
4.2.1.13 Bestimmung der DNA-Konzentration	44
4.2.1.14 Analytischer Verdau gewonnenen Plasmid-DNA zur Kontrolle der Schnittmuster	44
4.2.1.15 Analyse des Restriktionsverdaus mittels Elektrophorese	46
4.2.1.16 Linearisierung des Plasmids	46
4.2.1.17 Phenolextraktion	46
4.2.2 Zellbiologische Methoden	47
4.2.2.1 Kultivierung von Zellen	47
4.2.2.2 Passagierung	47
4.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl	48
4.2.2.4 Einfrieren der Zellen	48
4.2.2.5 Auftauen von Zellen	48
4.2.3 Transfektion der Zelllinien MCF7 und T47D mit den konstruierten Plasmiden	49
4.2.4 Stabile Transfektion	50
4.2.5 Nachweis der Integration der Vektoren in das Genom	52
4.2.6 Präparation genomischer DNA und die Polymerasekettenreaktion (PCR)	53
4.2.7 Nachweis des Expression von SOAT	55
4.2.8 RNA Präparation aus Zellen	55
4.2.9 cDNA Synthese Reverse Transkription; von RNA zu cDNA Synthese	56
4.2.10 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	57
4.2.11 Quantitative RT-PCR	58

4.2.12	Transportassay in SOAT transfizierten MCF7 und T47D mit radioaktiv markierter Substanzen	59
4.2.13	Proliferationsassay bei SOAT-transfizierten MCF7 und T47D durch den Einbau von [ $^3\text{H}$ ]Thymidin	62
4.2.14	Hemmung der SOAT-vermittelten Proliferationssteigerung	64
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	66
5.1	Klonierung der Vektoren	66
5.1.1	hSOATF3	66
5.1.2	SOATi2Neo4 und SOATiKontrolle1Neo4	67
5.2	Stabile Transfektion der Zelllinien MCF7 und T47D	70
5.3	Nachweise der Integration der Vektoren in das Genom	71
5.3.1.	Ergebnis der Polymerasekettenreaktion (PCR)	71
5.3.2.	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	74
5.3.3	Quantitative Analyse der SOAT mRNA-Expression	75
5.4	Transportassay	77
5.4.1	Steroidsulfat-Aufnahme in SOAT transfizierten MCF7 und T47D Zellen	77
5.5	Etablierung des Proliferationsassays: Bestimmung der optimalen Bedingungen	83
5.5.1	Bestimmung des Proliferationsverhaltens der Zelllinien unter Steroidsulfaten	85
5.5.2	Hemmung des SOAT-vermittelten Proliferationssteigerung bei transfizierten Zellen	91
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	98
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	106
<b>8</b>	<b>Summary</b>	107
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	108
<b>10</b>	<b>Anhang</b>	119
<b>11</b>	<b>Danksagungen</b>	122

## Abkürzungen

2-SMP	2-Sulfooxymethylpyren
4-SMP	4- Sulfooxymethylpyren
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-Binding-Cassette
ASBT	Apical sodium-dependent bile acid transporter
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BSP	Bromsulphalein
cDNA	complementary DNA
Ci	Curie
Cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
cRNA	complementary RNA
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
dpm	disintegration per minute (Zerfall pro Minute)
E <sub>1</sub>	Estron
E <sub>2</sub>	Estradiol
E <sub>3</sub>	Estriol
E <sub>1</sub> S	Estron-3-Sulfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Estrogenrezeptor
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HEK	human embryonic kidney
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
ISBT	Ileal sodium-dependent bile acid transporter
IU	International Unit (Internationale Einheit)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	liter
LB	Luria Bertani
M	Molar (Mol pro Liter)
mA	Milliampere
MCS	Multiple cloning site
MDR	Multidrug-resistance
min	Minute
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MRP	Multidrug-resistance-associated protein
NTCP	Na <sup>+</sup> /taurocholate cotransporting polypeptide
NZY	NZ-amine/yeast extract
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline

PCR	Polymerase chain reaction
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der $H_3O^+$ -Ionenkonzentration
PREGS	Pregnenolonsulfat
RNA	Ribonucleic acid
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transcriptase–PCR
s	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOAT	Sodium-dependent Organic Anion Transporter
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TLCS	Sulfotaurolithocholat
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur der Primer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Triton X-100	Octylphenylpoly(ethylenglykolether)
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt

**Genetischer Code**

<b>Erste Base</b> (5'-Ende)	<b>Zweite Base</b> (Drei- und Einbuchstabencode für Aminosäuren)				<b>Dritte Base</b> (3'-Ende)
U	U	C	A	G	U C A A
	UUU Phe-F	UCU Ser-S	UAU Tyr-Y	UGU Cys-C	
	UUC Phe-F	UCC Ser-S	UAC Tyr-Y	UGC Cys-C	
	UUA Leu-L	UCA Ser-S	UAA Stop	UGA Stop	
	UUG Leu-L	UCG Ser-S	UAG Stop	UGG Trp-W	
C	CUU Leu-L	CCU Pro-P	CAU His-H	CGU Arg-R	U C A G
	CUC Leu-L	CCC Pro-P	CAC His-H	CGC Arg-R	
	CUA Leu-L	CCA Pro-P	CAA Gln-Q	CGA Arg-R	
	CUG Leu-L	CCG Pro-P	CAG Gln-Q	CGG Arg-R	
A	AUU Ile-I	ACU Thr-T	AAU Asn-N	AGU Ser-S	U C A G
	AUC Ile-I	ACC Thr-T	AAC Asn-N	AGC Ser-S	
	AUA Ile-I	ACA Thr-T	AAA Lys-K	AGA Arg-R	
	AUG Met- M	ACG Thr- T	AAG Lys- K	AGG Arg-R	
G	GUU Val-V	GCU Ala-A	GAU Asp-D	GGU Gly-G	U C A G
	GUC Val-V	GCC Ala-A	GAC Asp-D	GGC Gly-G	
	GUA Val-V	GCA Ala-A	GAA Glu-E	GGA Gly-G	
	GUG Val-V	GCG Ala-A	GAG Glu-E	GGG Gly-G	

- AUG ist sowohl Initiationssignal als auch der Code für interne Met-Reste

**Vorsätze im Dezimalsystem**

<b>Potenz</b>	<b>Vorsilbe</b>	<b>Kurzzeichen</b>	<b>Potenz</b>	<b>Vorsilbe</b>	<b>Kurzzeichen</b>
$10^{15}$	Peta	P	$10^{-15}$	Femto	f
$10^{12}$	Tera	T	$10^{-12}$	Piko	p
$10^9$	Giga	G	$10^{-9}$	Nano	n
$10^6$	Mega	M	$10^{-6}$	Mikro	$\mu$
$10^3$	Kilo	k	$10^{-3}$	Milli	m
$10^2$	Hekto	h	$10^{-2}$	Centi	c

# 1 Einleitung

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen mit einem Anteil von 24% an den Krebsneuerkrankungen von Frauen. Jährlich erkranken in Deutschland mehr als 47.500 Frauen an Brustkrebs. Für die Vereinigten Staaten von Amerika wurden von Jemal et al. (2008) für 2008 182.460 Erkrankungen angenommen und 40.480 durch Brustkrebs verursachte Todesfälle. (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2004; Gesundheitsberichterstattung des Bundes-Robert Koch Institut Mai 2005). Ein Hauptfaktor für die Entstehung von Brustkrebs ist die lebenslängliche Exposition gegenüber Estrogenen. Deshalb entwickeln Frauen diese Krebserkrankung 100mal häufiger als Männer (Santen et al. 2007). Brustkrebs bei Männern ist demgegenüber so selten, dass sich internationale Experten über die genaue Zahl nicht einig sind. Etwa zwischen einem halben und einem Prozent aller Brustkrebsdiagnosen werden bei männlichen Patienten gestellt.

Auch für die weitere Tumorprogression haben Estrogene eine hervorragende Bedeutung, da in etwa zwei Drittel aller Mammakarzinome Estrogenrezeptoren nachgewiesen werden können und das Wachstum dieser Mammakarzinome Estrogen-abhängig ist (Henderson et al. 1988; Carlsson 1984). Diese besondere Bedeutung spiegelt sich wider in dem Erfolg der Therapie mit Estrogenrezeptor-Antagonisten und in der prognostischen Bedeutung des Steroidrezeptorgehalts der Tumorzellen (Duffy 2005).

Die große Mehrheit von Mammatumoren entsteht nach der Menopause, obwohl in der Postmenopause der Spiegel freier Plasmaestrogene unter dem biologisch wirksamen Niveau liegt. Dieser scheinbare Widerspruch der Estrogenabhängigkeit und der hohen Altersinzidenz der Mammatumore erklärt sich aus der Tatsache, dass die Plasmakonzentrationen von sulfatierten Steroiden auch in diesem Lebensabschnitt in relevantem Maß erhalten bleiben. Abweichend von dem Dogma der ovariellen Estrogensynthese hat sich herausgestellt, dass die benötigten Estrogene im Tumorgewebe selbst aus diesen sulfatierten Steroiden gebildet werden. Es sind in erster Linie Estron-3-Sulfat ( $E_1S$ ) und Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEAS), ein Androgen aus der Nebenniere. Dieser Vorgang wird als intrakrine Estrogensynthese bezeichnet. Es wird angenommen, dass die intrakrine Synthese von Estrogenen in peripherem Gewebe vor der Menopause etwa 75 % und in postmenopausalen Frauen nahe 100 % der gesamten Estrogenbildung ausmacht (Labrie 1991).

Während die freien Steroide Estron ( $E_1$ ), Estradiol ( $E_2$ ), Estriol ( $E_3$ ) und Androstendiol den intrazellulären Estrogenrezeptor (ER) durch Diffusion erreichen und aktivieren können (Krishnan et al. 2000), ist die intrakrine Hormonproduktion aus den Vorläufermolekülen  $E_1S$  und DHEAS auf Transportsysteme angewiesen, da diese Moleküle aufgrund ihres pK<sub>a</sub> als gut wasserlösliche Substanzen die Zellmembran nicht durch Diffusion passieren können.

Bisher ist der Transportmechanismus der sulfatierten Steroidhormone an Brustdrüsentumorzellen noch weitgehend ungeklärt. Für den intrazellulär gerichteten Import kommen unter anderem der in Gießen klonierte Natrium-dependent Organic Anion Transporter (SOAT, Geyer et al. 2004) in Frage. Dieses 2004 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen klonierte Transporter vermittelt bei Expression in HEK293-Zellen einen Natrium-abhängigen Transport der sulfatierten Steroide  $E_1S$ , DHEAS und Pregnenolonsulfat (PREGS) (Geyer et al. 2007). Es gehört zu der Transporterfamilie SLC10 und wird hier auch als SLC10A6 bezeichnet.

Durch den Nachweis der SOAT-Expression in Mammatumorgewebe (Meerkamp et al. 2008) stellt sich die Frage, ob SOAT funktionell an der intrakrinen Steroidsynthese in Estrogen-abhängigen Mammatumoren beteiligt ist.

Um diese Frage zu beantworten wurden als Modell die Zelllinien T47D und MCF7 gewählt. Diese Linien zeigen neben einer Stimulierbarkeit durch freie Estrogene auch eine Steigerung der Proliferation durch die sulfatierten Steroide  $E_1S$  und DHEAS. In zwei parallelen Ansätzen sollte zum einen der Einfluss einer SOAT-Überexpression und zum anderen der Einfluss einer Unterdrückung der Expression durch Anwendung der RNA-Interferenz auf das Proliferationsverhalten unter sulfatierten Steroiden untersucht werden.



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Estrogensynthese bei der Frau

Estrogene sind von ihrer Struktur Steroidhormone. Zu den wichtigsten natürlichen Estrogenen zählen Estron ( $E_1$ ), Estradiol ( $E_2$ ), und Estriol ( $E_3$ ). Bei der prämenopausalen Frau sind die Granulosazellen des reifenden Follikels der Ovarien der Hauptort der Estrogenbiosynthese. Während der Schwangerschaft findet die Synthese auch in der Plazenta statt. Weitere Synthesorte sind das ZNS (Zentrales Nervensystem), die Muskulatur, die Leber, das Endometrium, das Unterhautfettgewebe und in geringem Maße die Nebennierenrinde (NNR). Neben diesen Estrogenen werden auch von der Frau, vor allem in der Nebenniere, auch Androgene gebildet. Hierbei handelt es sich in erster Linie um DHEA. Mit Hilfe der Sulfotransferase erfolgt zum Teil in der Nebennierenrinde (NNR), aber auch in der Leber die Sulfokonjugation von DHEA zu DHEAS an Position 3 des Sterangerüsts, welches das häufigste zirkulierende Steroid des Menschen und anderer Primaten ist (Sato et al. 2005). Analog wird auch  $E_1$  zu  $E_1S$  metabolisiert. Diese  $E_1S$  stellt die große Mehrheit der zirkulierenden Estrogene, unabhängig ob prä- oder postmenopausal (Sasano et al. 2006). Durch die Abspaltung des Konjugats mit Hilfe der Steroidsulfatase werden Estrogene bzw. Androgene wieder bioverfügbar.

Vor der Menopause findet Estrogen- und Progesteronbildung in den Ovarien statt. Sie wird vom Hypothalamus über die Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) und dem Hypophysenvorderlappen (HVL) über das follikelstimulierende (FSH) und luteinisierende Hormon (LH) gesteuert. Der Transport der Estrogene im Blutplasma erfolgt zum größten Teil durch die Kopplung an entsprechende Transportproteine, Steroidhormon-bindene Globuline (SHGB) oder Albumine. Estrogene binden mit unterschiedlicher Affinität an SHGB oder Albumine. Im Zytosol oder Zellkern erfolgt die Kopplung des Estrogens an einen spezifischen Rezeptor. Die Hormon-Rezeptor-Komplexe binden an DNA-Abschnitte und steuern die Expression bestimmter Gene.

Nach der Menopause kommt die ovarielle Estrogenproduktion fast zum Erliegen. Estrogene werden dann in erster Linie durch die Freisetzung bzw. Konvertierung von  $E_1S$  oder DHEAS erzeugt. Diese Synthese von Estrogenen findet hauptsächlich in peripheren Geweben statt. Diese sind Haut, Muskel, Fett, Knochen und die Brustdrüse. Sie wird durch das Enzym Aromatase, ein Mitglied der Cytochromperoxidasen, katalysiert (Sasano et al. 2006).  $E_1S$  hat mit 10-12 h eine relativ lange Halbwertszeit im peripheren Blut, insbesondere im Vergleich mit Estradiol ( $E_2$ ), welches eine Halbwertszeit von 20 min hat (Woo et al. 1996). Die natürliche Plasmakonzentration von  $E_1S$  ist zudem 10-fach höher, als diejenige des unkonjugierten Estrons ( $E_1$ ) oder des  $E_2$  (Suzuki et al. 2003-A).

## 2.2 Mammakarzinome

### 2.2.1 Allgemeine Genese

Während in der Altersgruppe bis 45 Jahre nur 20,8 Erkrankungen pro 100.000 Personen beobachtet werden, treten bei den 45-60-jährigen 186,7 und bei den 60-75-jährigen 238,5 Erkrankungen pro 100.000 Frauen auf (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2004; Gesundheitsberichterstattung des Bundes Robert Koch Institut Mai 2005). Diese Zunahme weist die gleiche alterskorrelierte Steigerung auf, die durchschnittlich für alle erfassten Krebserkrankungen festzustellen ist.

Mammatumore zeigen zu ~95 % ein primär Estrogen-abhängiges Wachstum. Dies kann im Verlauf der Erkrankung verlorengehen, so dass der Tumor Estrogen-unabhängig wird. Zwei Drittel der Mammatumore zeigen jedoch dauerhaft eine Estrogenabhängigkeit. Die Estrogenabhängigkeit ist bemerkenswert, da sie der Altersinzidenz auf den ersten Blick zu widersprechen scheint. Die Frauen in der Altersgruppe mit der höchsten Inzidenz befinden sich in der Postmenopause, in der die Plasma-Estrogenspiegel sehr niedrig sind. Es wurde von verschiedenen Autoren gezeigt, dass bei postmenopausalem Auftreten von Brustkrebs die Estradiolgehalte in dem entarteten Gewebe mit bis zu 1,4 pmol/g deutlich über dem Plasmaspiegel von 0,06 pmol/ml liegen (Tab. 1 und 2).

Tab. 1: Plasma-Estrogenkonzentrationen bei gesunden Frauen und Brustkrebs-Patientinnen in pmol/ml (Übersicht von Pasqualini et al. 1996)

	Estron		Estradiol		Estrone-3-sulfate	
	gesund	Brustkrebs	gesund	Brustkrebs	gesund	Brustkrebs
<b>Premenopausal</b>						
Follicularphase	0.16±0.04	0.19±0.08	0.25±0.07	0.21±0.13	1.86±0.50	3.64±1.17
Lutealphase	0.21±0.04	0.21±0.04	0.35±0.08	0.23±0.06	4.17±0.21	3.97±1.88
<b>Postmenopausal</b>						
	0.12±0.04	0.17±0.05	0.04±0.02	0.06±0.03	0.52±0.13	0.37±0.19

Tab. 2: Brustgewebs-Estrogenkonzentrationen in Brustkrebsgewebe in pmol/g (Übersicht von Pasqualini et al. 1994 und 1996)

	Estron	Estradiol	Estrone-3-Sulfat
<b>Premenopausal</b>	1.40±0.08	1.20±0.60	1.27±0.36
<b>Postmenopausal</b>	1.00±0.15	1.40±0.70	3.35±1.85

Die intratumoralen Estradiolniveaus von premenopausalen und postmenopausalen Brustkrebs-Patientine sind nicht bedeutsam verschieden, aber das intratumorale Estradiol/Estron Verhältnis ist in postmenopausalem Brustkrebsgewebe signifikant höher als in premenopausalem (Miyoshi et al. 2001). Das Verhältnis zwischen der

Estradiol-Konzentration zwischen entartetem Gewebe und Plasma ist in premenopausalen Mammakarzinomen 5:1 während es in postmenopausalen Mammakarzinomen 23:1 beträgt (Pasqualini et al. 1996; Pasqualini 2004). Vergleicht man die Konzentration von Estradiol in Brustkrebs-Gewebe und Arealen des Brustgewebes, welche morphologisch als normal angesehen wurden, so liegen sie im ersteren 2,3-mal höher (Chetrite et al. 2000).

Der scheinbare Widerspruch zwischen Altersinzidenz und Estrogenabhängigkeit könnte damit erklärt werden, dass zahlreiche Gewebe, unter anderem auch gesundes und entartetes Brustkrebsgewebe, die nötige Enzymausstattung besitzen, um aus Steroidsulfaten wie E<sub>1</sub>S und vor allem DHEAS Estrogene zu bilden.

Tumorentstehung im Allgemeinen findet nur statt, wenn das mehrstufige Überwachungssystem des Organismus ausgeschaltet wird. Das wohl bekannteste Tumorsuppressorgen ist das p53 – ein Transkriptionsfaktor. Es ist entscheidend an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt. Mehr als die Hälfte aller Tumoren weist Mutationen im p53-Gen auf (Hollstein et al. 1991). Infolge dieser Mutationen kann es sowohl zu einem Funktionsverlust („lost of function“) für Wildtyp-p53 als auch zu einem Funktionszugewinn („gain of function“) kommen, in dem die Expression eines veränderten Proteins mit neuer, onkogener Eigenschaft resultiert (Roemer 1999). p53 liegt als multifunktionelles, nukleäres Protein in ungestressten Zellen inaktiv und in sehr geringen Konzentrationen vor. Man ordnet ihm eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Aufrechterhaltung der Zellfunktion und des Zellzyklus zu. p53 wird durch zahlreiche genotoxische Stressfaktoren wie z.B. DNA-Schädigungen (Nelson et al. 1994), Hypoxie (Graeber et al. 1996), Bestrahlung, Onkogenaktivierung (Lowe et al. 1993), Hitzeschock sowie Applikation von Zytostatika (Vogelstein et al. 2000; Vousden 2002) aktiviert. Diese Aktivierung äußert sich in einem raschen Anstieg der p53-Konzentration in der Zelle und in der Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor. p53 triggert somit verschiedene zelluläre Reaktionen. Dazu zählt hauptsächlich Wachstums hemmung durch das Anhalten des Zellzyklus oder die Apoptose. Zusätzlich spielt p53 eine Rolle in der zellulären Differenzierung (Almog et al. 1997), der DNA-Reparatur und somit der Genomstabilität (Tanaka et al. 2000), der Inhibierung von Angiogenese (el-Deiry 1998), als auch bei der Wachstumsunterdrückung von Tumoren (Zhu et al. 1999). Damit ist p53 ein wichtiges Kontrollprotein der Zelle, das auf DNA-Schädigungen reagiert, in dem es das Weiterwachsen der geschädigten Zelle verhindert (Levine 1997). Kommt es zu chemischen Veränderungen der DNA, führt dies zu einer Akkumulation von p53 durch verlangsamten Abbau. Durch die schnelle Akkumulation großer Mengen des Proteins werden wiederum im Zellkern bestimmte Gene aktiviert. Diese Gene, p53-reguliert, führen ihrerseits entweder zu einem Stop des Zellzyklus der geschädigten Zelle bis Reparaturmechanismen den genomischen Schaden ausge bessert haben oder sie induzieren den programmierten Zelltod (Apoptose), falls der Schaden zu groß ist. In jedem Fall müssen

diese Kontrollmechanismen die Weitergabe des genomischen Schadens an die Tochterzellen während der Mitose und somit die Entstehung von verändertem, genetisch instabilem Genom verhindern, da diese Zellen sonst ein hohes Risiko für einen Übergang in Tumorzellen besitzen würden. Somit besitzt p53 entscheidende regulatorische Funktionen, welche an den Restriktionspunkten des Zellzyklus wirksam werden: Zum einen am Restriktionspunkt vor der S-Phase des Zellzyklus, wo es zur DNA-Neusynthese und somit zur Bildung eines neuen DNA-Stranges kommt und zum anderen vor der Mitose, in welcher das genetischen Material auf die Tochterzellen verteilt wird. Kommt es aber zu Störungen dieser wichtigen Kontrollpunkte, wird die genetische Information dauerhaft verändert, und Fehler, welche sowohl in der Replikationsphase als auch in der fehlerhaften Verteilung des genetischen Materials in der Mitose entstanden sind, werden durch die Weitergabe an die Tochterzellen fixiert. Dann kommt es trotz auftretender Genomschäden zu keinen Reparaturversuchen und auch die Apoptose kann nicht eingeleitet werden.

### **2.2.2 Form, Verlauf und Bedeutung des Brustkrebses**

Viele verschiedene Faktoren führen zur Brustkrebsentstehung. In der Reihe nach Risikopotential: Familiäre Belastung durch Brustkrebserkrankungen in der Verwandtschaft, ein Alter über 50 Jahren, eine bereits aufgetretener gutartiger Mammatumor, Fettleibigkeit, hohe Knochendichte, späte Schwangerschaft und Menopause, frühe Menarche sowie die Hormon-Ersatztherapien (Santen et al. 2007). Unter den verschiedenen Krebsarten bei Frauen führt Brustkrebs am häufigsten zum Tode, besonders nach der Menopause. Estrogen ist ein wichtiger Risikofaktor für die Progression von Mammatumoren, zwei Drittel der Brustkrebszellen sind sensitiv für Estrogene, d. h. ihr Wachstum wird durch Estrogene gesteigert (Henderson et al. 1980).

Eine hohe Konzentration von Estrogenen kann bereits die Entstehung und das Wachstum von Brustkrebs fördern. Die karzinominduzierenden Eigenschaften der endogenen bzw. exogenen Estrogene beruhen unter anderem auf der starken Estrogenrezeptor-abhängigen Stimulation des Zellwachstums. Das heißt, dass Estrogene über die Aktivierung des Estrogenrezeptors (ER) die G1-Phase des Zellzyklus verkürzen können, so dass sich die Zellen häufiger teilen. Antiestrogene wie z.B. Tamoxifen® hemmen den ER und arretieren die Estrogen-abhängigen Zellen (Osborne 1998). Mit zunehmender Zellproliferation nimmt durch die gestiegene Zahl der Zellteilungen das Risiko für Mutationen zu (Santen et al. 2009).

Ein Teil der Mammakarzinome exprimiert jedoch keinen ER und kann weder durch Estrogene stimuliert noch durch Antiestrogene gehemmt werden; es handelt sich um estrogenunabhängige Tumoren (Israel und Saez 1978). Neben Estrogenen existieren weitere Risikofaktoren für die Entstehung von Brustkrebs. Mit dem höchsten Risiko ist derzeit das

Vorliegen einer Mutation des Tumorsuppressor-Genes BRCA1 (breast cancer 1) behaftet (Hamann 2000).

Die meisten (ca. 95 %) der Mammatumore sind, unabhängig ob in prä- oder postmenopausalen Frauen, zuerst hormonabhängig, wobei das Hormon Estradiol eine entscheidende Rolle in ihrer Entwicklung und Progression spielt. Auch unter physiologischen Bedingungen, bei der Brustzellproliferation, Menstruation oder der Reproduktion sind Estrogene der primäre Anreiz für die proliferierenden Zellen (Henderson et al. 1988). Während des reproduktiven Lebensabschnitts einer Frau stellen die Eierstöcke den Hauptteil systemischer Estrogene her. Diese Produktion der Estrogene nimmt nach den Menopause ab, während die Nebennieren weiter C19-Steroide synthetisieren, vor allem DHEA, und diese in sulfatierter Form ins Blut abgeben (Le Bail et al. 1998). Auch wenn die Plasmakonzentration von DHEAS mit dem Alter abnimmt, liegt der Plasmaspiegel von Männern und Frauen im fortgeschrittenen Alter noch bei ungefähr 1  $\mu$ M (Ravaglia et al. 1996). Die Androgene der Nebenniere können in Estrogene umgewandelt werden. Eines der Schlüsselenzyme für diese Estrogensynthese ist die Aromatase: Sie katalysiert die Umgestaltung von C19-Steroiden, wie zum Beispiel Androst-4-en-3,17-dione (Adione) und Testosteron, zu  $E_1$  bzw.  $E_2$  (Abul-Hajj 1975; Joyeux et al. 1997).

In hormonabhängigen Zellen ist die Wechselwirkung des Hormons mit dem Rezeptormolekül der grundlegende Schritt, um einen Hormon-Spezifischen Effekt hervorzurufen. Die Mehrheit der Mammatumore kommt während der postmenopausalen Lebensphase vor, wenn die Eierstöcke aufgehört haben hormonell aktiv zu sein. In dieser Lebensphase sind die Plasmaestrogenspiegel, wie oben bereits angeführt, sehr niedrig. Trotz des niedrigen Niveaus von zirkulierenden Estrogenen, sind die Konzentrationen von  $E_1$ ,  $E_2$  und deren Sulfaten ( $E_1S$ ,  $E_2S$ ) in Mammatumorgewebe hoch, sogar mehrfach höher als diejenigen, die im Plasma oder auch in Gebieten der selben Brust, die als gesund angenommen wurden, nachgewiesen werden konnten. Dies führte zu der Annahme, dass eine Biosynthese und Akkumulation dieser Hormone im Brustkrebsgewebe selbst stattfindet (Übersicht Pasqualini 2004).

Verschiedene Faktoren könnten die Ansammlung der Steroide verursachen. So könnte eine höhere Aufnahme und Akkumulation aus dem Plasma und/oder eine lokale Bildung des starken ER-Agonisten  $E_2$  selbst aus Cholesterol oder näheren Vorläufermolekülen, z. B.  $E_1S$  dazu führen. Labrie et al. (1991 und 1998) konnten zeigen, dass es in Zellen zur Bildung von aktiven Estrogenen aus den Vorläufersubstanzen DHEAS und  $E_1S$  kommt. Diese lokale Bildung von Hormonen in den Zellen, in denen sie ihre Wirkung zeigen, wurde als intrakrine Aktivität (Intracrine activity) bezeichnet (Suzuki et al. 2003-A).

## 2.3 Intrakrinologie

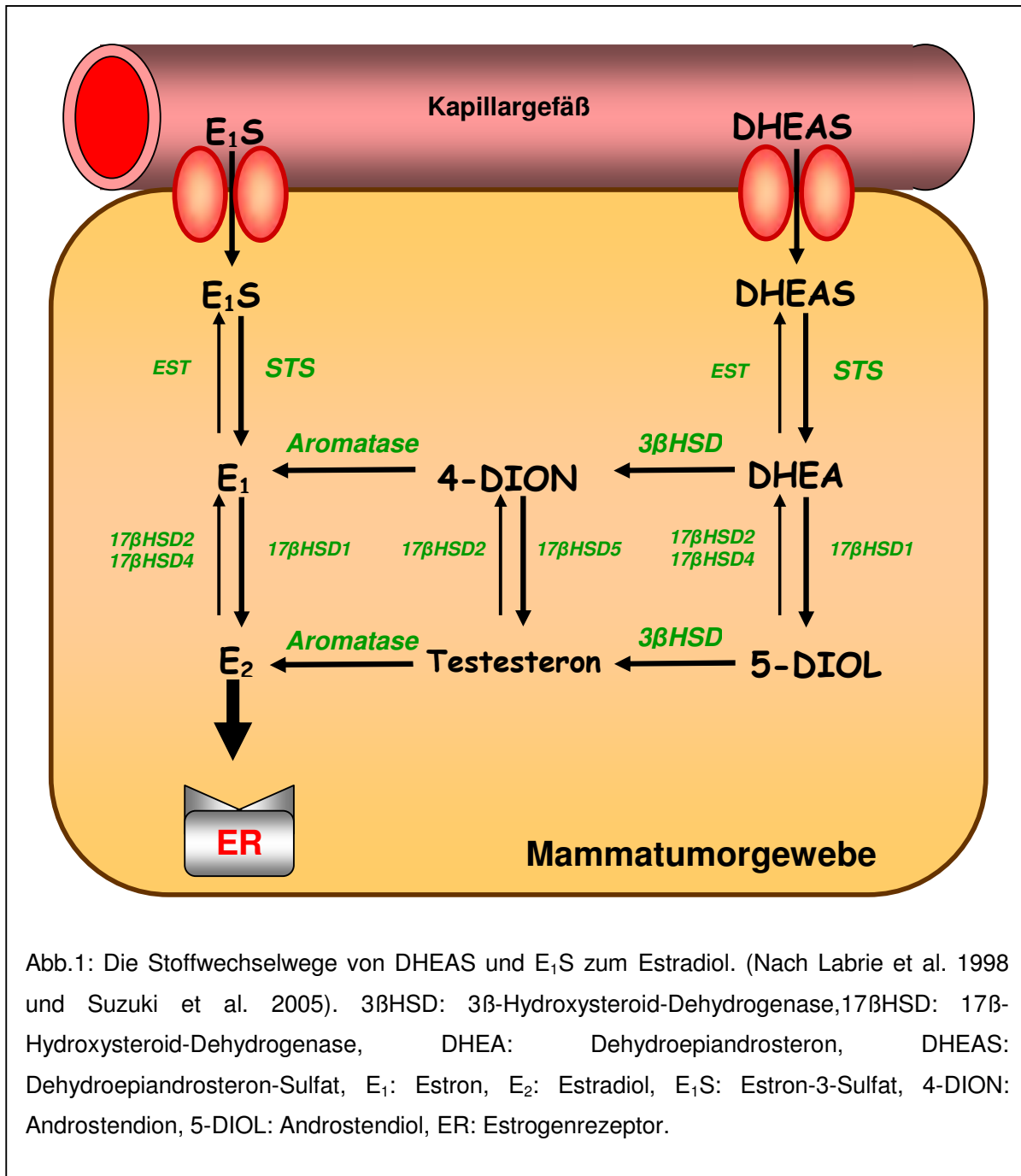
Da bei der postmenopausalen Frau die systemische Konzentration an (aktiven) Estrogenen sehr niedrig ist, wurde von mehreren Arbeitsgruppen eine lokale Synthese aus (inaktiven) Estrogensulfaten oder Androgenen im Brustgewebe angenommen (Le Bail et al. 1998; Pasqualini et al. 1997; Suzuki et al. 2005). Die Bildung aus Sulfaten wurde wegen ihrer Schlüsselenzyme, der Steroidsulfatase und der Aromatase als Sulfatase- bzw. Aromataseweg bezeichnet. Beim Sulfataseweg wird das biologisch inaktive  $E_1S$  intrazellulär zu bereits hormonell aktivem  $E_1$  hydrolysiert und dann durch eine  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ( $17\beta$ HSD) zum stärksten endogenen ER-Agonisten  $E_2$  reduziert (Santner et al. 1984 und 1986; Pasqualini et al. 1997). Da die Konzentration an  $E_1S$  mit 2,5-15 nM im Plasma (Remy-Martin et al. 1983; Platia et al. 1984) etwa 10-fach höher liegt als die Konzentration der unkonjugierten Estrogene, und die Plasmahalbwertszeit des  $E_1S$  mit 10-12 h deutlich länger ist als die von  $E_1$  und  $E_2$  (20-30 min) gilt  $E_1S$  als wichtigstes Reservoir aktiver Estrogene (Ruder et al. 1972; Geisler 2003).

Über den Aromatase-Weg, werden Androgene aus der Nebenniere (DHEA, Androstendion) durch die  $3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ( $3\beta$ HSD),  $17\beta$ HSD und Aromatase in Estrogene umgewandelt (Sasano et al. 1996; Labrie et al. 1998). Durch die Kombination beider Wege wird auch DHEAS, welches das Hauptprodukt der Nebenniere darstellt und in einer ca. 100-fach höheren Konzentration (2-10  $\mu$ M) als das unkonjugierte DHEA im Blut zirkuliert (Baulieu 1996), für die Estrogensynthese zugänglich. Dieser Weg ist insbesondere bei postmenopausalen Frauen von Bedeutung, da im Alter die DHEAS-Konzentration nur wenig abnimmt (2-3  $\mu$ M) (Baulieu 1996; Morris et al. 2001), die Estrogensynthese in den Ovarien aber fast völlig zum Erliegen kommt.

DHEAS zirkuliert auch nach der Menopause in mikromolaren Konzentrationen im Blut (Übersicht bei Labrie et al. 1998). Für die Synthese von Estrogenen aus DHEAS werden beide Stoffwechselwege beansprucht. Der erste Schritt, die Desulfatierung der Steroidsulfate, wird durch die Steroid-Sulfatase vermittelt. Die Blockade der Steroid-Sulfatase ist aktuell Gegenstand der Krebsforschung (Nussbaumer und Billich 2005).

Nach der Freisetzung der Steroide aus den Sulfatverbindungen liegen freies  $E_1$  und DHEA in der Zelle vor.  $E_1$ , das selbst estrogene Aktivität besitzt, wird durch die  $17\beta$ HSD in das wirksamste endogene Estrogen  $E_2$  umgewandelt. DHEA, von der Struktur ein Androgen, wird primär durch die  $3\beta$ HSD in Androstendion bzw. durch die  $17\beta$ HSD in Androstendiol umgewandelt. Androstendiol kann schließlich durch die  $3\beta$ HSD in Testosteron umgewandelt werden. Die beiden Androgene Androstendion und Testosteron sind Substrate der Aromatase. Dieses Enzym ist nunmehr in der Lage, die A-Ringe der Androgene zu

aromatisieren und somit  $E_1$  (aus Androstendion) und  $E_2$  (aus Testosteron) entstehen zu lassen (Abb. 1).



### 2.3.1 Estrogenrezeptoren

Steroidhormone wirken über die Bindung an intrazelluläre, hoch affine Rezeptoren der Steroidrezeptor-Superfamilie, einer Klasse ligandenabhängiger Transkriptionfaktoren (Beato und Klug 2000; Legler et al. 1999). Zu dieser Gruppe gehören alle Steroidrezeptoren. Sie haben ihren Sitz im Nucleus und im Zytoplasma und wirken nach Ligandenbindung direkt auf die Genexpression. Im Falle von Estrogen kommt es nach intrakriner Estrogen-synthese in der Zelle zur Bindung an den Estrogenrezeptor (ER). Dieser liegt in Abwesenheit eines Liganden zunächst gebunden an Heat-Shock-Proteine (HSP), wie HSP90, vor (Beato 1989; Tsai und O'Malley 1994; Yamashita 1998). Die durch Estrogenbindung bewirkte Konformationsänderung führt zur Dissoziation der HSPs vom ER sowie anschließender Homo- und Heterodimerisierung und Phosphorylierung des Rezeptors (Hall et al. 1999; Osborne und Schiff 2005). Der humane Estrogenrezeptor besteht aus 595 Aminosäuren und besitzt auf seiner Oberfläche zwei verschiedene Bindungsdomänen, eine für den Liganden (LBD) und eine für die Bindung an die DNA (DBD). Bindet der Ligand an den Rezeptor, so findet durch Phosphorylierung eine Konformationsänderung des Rezeptors statt. An der DNA-Bindungsdomäne bilden Cystein und Zink einen Chelatkomplex, den sogenannten "Zinkfinger", der die Bindung an die spezifischen DNA-Sequenzen, die „estrogen response elements“ (ERE), ermöglicht. Anschließend erfolgt die Gentranskription (Jazaeri et al. 1999; Legler et al. 1999). Der aktivierte Estrogen-Rezeptor-Komplex transloziert vom Zytoplasma in den Zellkern und bindet dort an palindromische DNA-Sequenzen der Zielgene, die sogenannten „Estrogen Responsive Elements“ (ERE) (Kumar und Chambon 1988). Diese befinden sich bei den meisten Genen in der Promotorregion nahe dem Transkriptionsstart. Durch die Interaktion des Rezeptordimers mit den EREs im Promotorbereich wird die Transkription der korrespondierenden Gene herunter- oder heraufreguliert, was zu einer veränderten Expression der von diesen Genen kodierten Proteine führt (Mangelsdorf et al. 1995; Beato et al. 1995; Beato und Klug 2000). Durch die Ligandbindung wirken die Rezeptoren als Transkriptionsfaktoren und induzieren Gene, die z. B. in der Zellproliferation, der Differenzierung und der Apoptose eine Rolle spielen (Mangelsdorf et al. 1995). Die transkriptionelle Aktivität des ER $\beta$  erreicht jedoch nur ca. 20 – 60 % der Aktivität des ER $\alpha$  (Hall et al. 1999), und der ER $\beta$  ist in vielen Geweben geringer exprimiert als der ER $\alpha$  (Kuiper und McDonnell 1996). Je nach Autor sind fast alle Mammakarzinome (ca. 95–97 %, Henderson et al. 1988) bzw. ungefähr 2/3 (Roodi et al. 1995) zumindest in frühen Stadien hormonabhängig bzw. ER-positiv.



### 2.3.2 Steroid Sulfatase (STS)

Steroid Sulfatase (STS) ist ein Enzym, das die Abspaltung einer Sulfatgruppe an Position 3 von Steroiden vermittelt. So hydrolysiert sie zum Beispiel  $E_1S$ , DHEAS und Cholesterin-Sulfat (Reed et al. 2005). Die zirkulierende Hauptform von Plasmaestrogenen in postmenopausalen Frauen ist  $E_1S$ , eine biologisch inaktive Form des  $E_1$ , das durch diese Reaktion in seine biologisch aktive Form überführt wird. Das Niveau des  $E_1S$  ist 5-10 mal höher als dasjenige von unkonjugierten Estrogen wie  $E_1$ ,  $E_2$  und  $E_3$  während des Menstruationszyklus und auch in postmenopausalen Frauen (Pasqualini 2004; Ruder et al. 1972). Somit spielt die STS eine wichtige Rolle bei der Bildung biologisch aktiver Steroide, die beteiligt sind an physiologischen und auch pathologischen Prozessen, wie dem Wachstum von Mammatumoren. STS katalysiert  $E_1S$  zu  $E_1$  im Brust-Karzinom (Abb. 1), und trägt damit zur lokalen Estrogenproduktion bei. Das STS-Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und seine Inaktivierung ist für die X-chromosomale rezessive kongenitale Ichthyose, eine Verhornungsstörung, verantwortlich (Hoffmann und Happle 1999). Das Enzym ist mikrosomalen Ursprungs und leistet einen Hauptbeitrag zu intrakrinen Estrogensynthese in hormon-abhängigen bösartigen Geweben und es wird angenommen, dass es ubiquitär exprimiert wird. Enzymatische Aktivität von STS wurde in der großen Mehrheit von Mammatumoren entdeckt, und sie ist beträchtlich höher als die Aktivität der Aromatase in Mammatumoren (Santner et al. 1984; Evans et al. 1994). Untersuchungen von humanen Gewebeproben zeigen, dass in malignem Brustgewebe die STS signifikant höher exprimiert ist als in gesundem Gewebe (Pasqualini et al. 1997; Utsumi et al. 2000). Wenig ist bekannt über die Regulation seiner Expression und Aktivität. IL-6 (Interleukin-6) und TNF $\alpha$  (Tumor Nekrosis Faktor- $\alpha$ ) stimulieren die STS Aktivität und haben synergistische Wirkung in ihrem Einfluss auf die Enzymaktivität, eventuell über eine post-transkriptionale Modifizierung des Enzyms (Newman et al. 2000). Über den Einfluss von Steroiden wurden widersprüchliche Daten veröffentlicht. Pasqualini und Chetrite (2005) fanden, dass Progestin und Antiestrogene die Expression und/oder Aktivität von STS in Brustkrebszellen hemmen; demgegenüber fanden Reed et al. (2005) eine Steigerung der Expression durch Androgene und Gestagene. Die Blockade der STS ist aktuell Gegenstand der Krebsforschung (Nussbaumer und Billich 2005).

Die STS kommt bei 90 % der untersuchten Brustkrebs-Proben vor, die Aromatase lediglich bei 60–70 % (James et al. 2001). Pasqualini et al. (1997) untersuchten auch die Aktivität der beiden Enzyme in Tumorgewebe und fanden, dass die Sulfataseaktivität 30-150 mal höher war als diejenige der Aromatase. Bei physiologischen Substrat-Konzentrationen wird von humanen Mammatumoren 10-fach mehr  $E_1$  über den Sulfatase-Weg als über den Aromatase-Weg synthetisiert (Santner et al. 1984). Quantitative Bestimmungen in Brustkrebs-Gewebe weisen darauf hin, dass die Synthese über den Sulfataseweg 40-500 mal höher als über den Aromataseweg ist (Chetrite et al. 2000). Der Sulfataseweg scheint klinisch wichtiger zu sein

als der Aromataseweg, da die Transkriptionsrate der Aromatase keinen prognostischen Wert hat (Reed et al. 2005).

### 2.3.3 Aromatase

Nebennierenandrogene können durch Aromatisierung in Estrogene umgewandelt werden. So kann zum Beispiel Testosteron zu  $E_2$  und Androstendion zu  $E_1$  katalysiert werden (Suzuki et al. 2005). Aromatase (CYP19A1), ein Mitglied der Cytochrom-P450-Superfamilie, ist eines der Schlüsselenzyme in dieser Estrogen-Synthese, und es ist bekannt, dass sie in vielen menschlichen Geweben, einschließlich der Plazenta, des Eierstocks, des Fettgewebes, des Gehirns, des Endometriums und des Synovialgewebes vorhanden ist (Le Bail et al. 2002).

Biochemische und immunohistochemische Studien haben die Anwesenheit dieses Enzyms in adipösen Stromazellen von Brustkrebsgeweben gezeigt. Obwohl das Niveau der Aromataseaktivität in Brustgewebe relativ niedrig ist, kann diese lokale Produktion von Estrogenen zur Pathogenese des Estrogen-abhängigen Brustkrebs beitragen (Pasqualini 2004).

Mehr als 70 % der untersuchten Brustkrebsproben hatten Aromataseaktivität vergleichbar mit oder größer als die, die in gesundem Gewebe gefunden wurde, und das mRNA Niveau der Aromatase in Mammakarzinomen war verglichen mit gesundem Gewebe deutlich erhöht (Suzuki et al. 2003-A).

### 2.3.4 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenase (17 $\beta$ HSD)

Die 17 $\beta$ HSD katalysiert beide Richtungen der Reaktion, sowohl die Reduktion als auch die Oxidation von Estrogenen oder Androgenen an Position 17 des Sterangerüsts. Sie wird in nahezu allen Geweben exprimiert. Bis heute sind 12 Isoformen der 17 $\beta$ HSD kloniert worden. Die verschiedenen Isoformen haben unterschiedliche Präferenz für die Reduktions- ( $E_1 \rightarrow E_2$ , DHEA  $\rightarrow$  Androstendiol, Androstendion  $\rightarrow$  Testosteron) oder Oxidationsreaktion ( $E_2 \rightarrow E_1$ , etc.). Nachgewiesen ist die präferentielle Reduktion von  $E_1$  zu  $E_2$  durch 17 $\beta$ HSD1 mit Umsetzung des Cofaktors NADPH (Suzuki et al. 2005) und die präferentielle Oxydation von  $E_2$  zu  $E_1$  oder Testosteron zu Androstenedion durch die 17 $\beta$ HSD2 und/oder 17 $\beta$ HSD4 unter Umsetzung von  $NAD^+$  als Cofaktor (Wu et al. 1993).

Oxidative 17 $\beta$ HSD-Aktivität ist die bevorzugte Reaktionsrichtung in gesundem Brustgewebe, die reduktive 17 $\beta$ HSD-Reaktion ist dominant in Brustkrebsgewebe (Speirs et al. 1998; Miettinen et al. 1999).

Miyoshi et al. (2001) berichteten, dass das intratumorale Estradiol/Estrone-Verhältnis in postmenopausalen Mammatumoren signifikant höher ist als in prämenopausalen. Dies deuteten die Autoren als deutlichen Hinweis auf die Bedeutung der reduktiven Aktivität der 17 $\beta$ HSD für die Erhaltung des hohen Estradiolniveaus in postmenopausalem Mammatumorgewebe. In hormonabhängigen Brustkrebs-Zelllinien, wie MCF7, T47D, R-27, und ZR75-1, ist 17 $\beta$ HSD1 die vorherrschende reduktive Isoform, indessen die oxidative 17 $\beta$ HSD-Aktivität die bevorzugte enzymatische Orientierung in hormonunabhängigen Brustkrebs-Zelllinien, wie MDA-MB-231, NDA-MB-436 und Hs-578S, (Pasqualini 2004).

mRNA Expression von sowohl 17 $\beta$ HSD1 als auch 17 $\beta$ HSD2 wurde in gesunden Brustdrüsen entdeckt (Gunnarsson et al. 2001). In postmenopausalen Mammakarzinomen ist das Niveau der mRNA von 17 $\beta$ HSD1 deutlich höher als in prämenopausalen (Miyoshi et al. 2001).

Gunnarsson et al. (2001) demonstrierten, dass Brustkrebs-Patienten, die ein hohes Niveau an 17 $\beta$ HSD1-mRNA oder fehlende 17 $\beta$ HSD2-mRNA Expression zeigen, gefährdet sind, nach Therapie Rezidive zu entwickeln. Simard und Gingras (2001) berichteten, dass IL-4 und IL-6 die oxidative 17 $\beta$ HSD-Aktivität in ZR-75-1 Zellen steigern, aber IL-4 die reduktive 17 $\beta$ HSD-Aktivität in T47D-Zellen stimuliert. Wirkungen von Cytokinen auf die 17 $\beta$ HSD-Aktivität scheinen sich in verschiedenen Zelllinien zu unterscheiden und Cytokine werden als wichtige Modulatoren der 17 $\beta$ HSD-Aktivität in Brustkrebsgewebe betrachtet (Purohit et al. 2002). Auch eine Induktion der 17 $\beta$ HSD1-Expression durch Progestin, einem synthetischen Gestagen, ist in mehreren Brustkrebs-Zellen (T47D, MCF7, HBL-100, MDA-MB-231, MDA-MB-361, MDA-MB-468 und ZR-75-1) untersucht worden, wurde aber nur in T47D Brustkrebs-Zellen bestätigt, (Poutanen et al. 1992; Pasqualini 2003), was teilweise die proliferative Wirkungen von Progestin auf Brustkrebs-Zellen über eine Erhöhung der Estrogene erklären kann. Die Autoren gestehen aber ein, dass weitere Überprüfungen erforderlich sind, um diese Hypothese zu unterschützen (Pasqualini 2003).

### 2.3.5 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase

3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 $\beta$ HSD) ist ein membrangebundenes Enzym, das verantwortlich ist für die Umwandlung von 3 $\beta$ -hydroxy- und 3-keto-5 $\alpha$ -androstane-Steroiden. 3 $\beta$ HSD1 wird vorherrschend in der Plazenta exprimiert, aber auch in verschiedenen nicht steroidogenen Geweben, wie der Haut und der Brust (Rheaume et al. 1991).

## 2.4 Prinzipien des Membrantransports

Zellmembranen bestehen aus einer Doppelschicht von Phospholipiden, in/an die Steroide, Kohlenhydrate und Proteine ein-, bzw. angelagert sind. Membranen sind die Grundvoraussetzung für die Bildung einer Zelle, da sie in dem Grundmedium Wasser durch ihre lipophilen Eigenschaften Räume abgrenzen, in denen unterschiedliche Stoffkonzentrationen enthalten sein können. Membranproteine stellen eine Voraussetzung für Stoff- und Informationsaustausch, Energietransduktion, Fortbewegung oder Kompartimentierungen dar. Lipophile Moleküle, darunter Gase (z. B. Inhalationsnarkotika), Steroidhormone, auch Desoxymethylsulfoxid, können Biomembranen in der Regel durch freie Diffusion unspezifisch durchqueren, im Fall von Inhalationsnarkotika sogar sehr schnell.

Im Gegensatz dazu steht der spezifische Transport, bei dem ganz bestimmte Moleküle oder Ionen durch ganz bestimmte Membranen transportiert werden. Diese Bedingung gilt sowohl polare oder geladene, als auch für hydrophile Moleküle, z. B. Glukose, Laktat, Aminosäuren, Gallensäuren, anorganische Ionen oder auch Neurotransmitter. Hydrophile Stoffe können biologische Membranen durch Diffusion nicht durchqueren. Ein geregelter und steuerbarer Transport dieser Moleküle über Membranen findet nicht spontan statt, sondern benötigt Transportsysteme. Für den vielfältigen Stoffaustausch zwischen den Kompartimenten einer Zelle und dem Austausch mit dem Extrazellularraum verfügen Zellen in ihren Biomembranen je nach ihrer Funktion über verschiedene Transportproteine.

Prinzipiell existieren zwei unterschiedliche Formen für den spezifischen Transport: Die katalysierte Diffusion und der aktive Transport.

Die katalysierte Diffusion geschieht ohne Energieverbrauch entlang eines Konzentrationsgefälles über die Membran. Trägt die Substanz dabei eine Ladung, so wird durch deren Transport neben der Konzentrationsdifferenz auch das elektrische Potential über die Membran (Membranpotential) beeinflusst. Der Konzentrationsgradient und der elektrische Gradient können zum elektrochemischen Gradienten zusammengefasst werden. Unter den Proteinen, die eine katalysierte Diffusion vermitteln, kann zwischen Kanälen und Carriern unterschieden werden.

Kanäle interagieren nur schwach mit dem zu transportierenden Solut. Sie bilden wässrige Poren, die sich durch die Lipid-Doppelschicht erstrecken und somit z.B. Ionen ermöglichen, die Membran zu passieren. Die Kanäle sind dabei hochspezifisch für ihre Substrate. Die Spezifität beruht hierbei meistens auf der Ladung der Ionen, sowie deren Hydrathülle. Der Transport durch Kanalproteine erfolgt erheblich schneller als beim Carrier-vermittelten Transport. Bei der Diffusion mittels Carrier lässt sich eine leicht erhöhte Diffusionsgeschwindigkeit feststellen, denn Carrier binden die zu transportierende Substanz spezifisch und geleiten sie mittels Konformationsänderungen durch die Membran. Carrier-

vermittelte Diffusion lässt sich anhand der folgenden Kriterien leicht bestimmen: Zum einen muß das System absättigbar sein, d.h. oberhalb einer bestimmten Konzentrationsdifferenz ändert sich die Diffusion trotz Konzentrationserhöhungen nicht mehr, da alle Carrier-Proteine maximal ausgelastet sind. Des Weiteren ist die Aktivität des Proteins temperaturabhängig. Letztlich sollten sich Inhibitoren für einen Carrier finden lassen, die selektiv den Transport eines Substrates unterbinden.

Der aktive Transport wird immer über Carrier vermittelt. Er benötigt Energie, um die Substanz gegen einen elektrochemischen Gradienten zu „pumpen“. Das TC-System (*transporter classification system*) teilt Carrier nach der Art der Energetisierung in verschiedene Gruppen ein (Saier 2000; Abb. 2). Die meisten für den energieabhängigen Transport verantwortlichen Proteine lassen sich in zwei Superfamilien einteilen, die „solute carrier“ (SLC)-Familie und die „ATP binding cassette“ (ABC)-Familie.

Ist der Transport direkt an die Hydrolyse von ATP gekoppelt, so wird er als primär aktiv bezeichnet. Zu den primär energieabhängigen Transportern gehört die Familie der ABC-Transporter (ATP-binding-cassette) (Borst und Elferink 2002) und die Ionen-transport-ATPasen (Blanco und Mercer 1998). Ein Beispiel für derartige Transporter ist die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, bei der durch Hydrolyse von ATP Natriumionen aus der Zelle geschleust und gleichzeitig Kaliumionen ins Innere der Zelle gepumpt werden.

Andere aktive Transportprozesse nutzen den durch die Aktivität dieser  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufgebauten physiologischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten für einen  $\text{Na}^+$ /Substrat-Cotransport in die Zelle. In analoger Weise können auch Protonen ( $\text{H}^+$ )-Gradienten zum Antrieb des Stofftransports verwendet werden. Man spricht dann von einem sekundär aktiven Transportprozess, da die ATP-Hydrolyse nur indirekt an den Transportprozess gekoppelt ist.

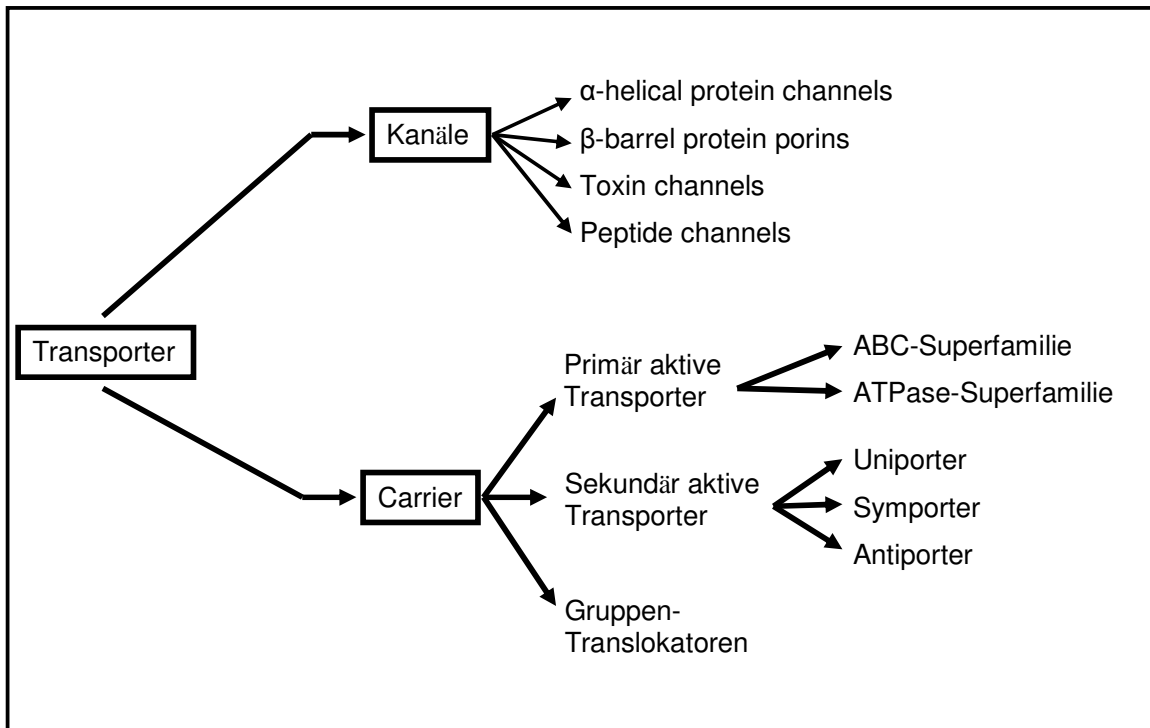


Abb. 2: Übersicht über Membrantransporter in biologischen Membranen nach dem TC-System ([www.biology.ucsd.edu/~msaier/transport](http://www.biology.ucsd.edu/~msaier/transport) und [www.tcdb.org](http://www.tcdb.org)). Die Transporter sind in zwei große Kategorien, Kanäle und Carrier, eingeteilt. Die Carrier werden nach der Energie-Kopplung in primär aktive Transporter (z.B. ABC- und ATPase-Superfamilien), sekundär aktive Transporter (Uniporter, Symporter und Antiporter), und die Familie der Gruppen-Translokatoren zusammengefasst.

Eine weitere Form der Energetisierung ergibt sich durch den entgegengesetzten Transport mit einem Molekül, welches ein Konzentrationsgefälle in entgegengesetzter Richtung hat.

Neben dem Energetisierungsprinzip können Transportproteine auch nach Transportrichtung und Zahl der transportierten Moleküle eingeteilt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass ein Molekül allein transportiert wird (Uniport) oder dass zwei verschiedene Moleküle gemeinsam in gleicher Richtung (Symport) oder in entgegengesetzter Richtung (Antiport) transportiert werden (Abb. 3). Ein typisches Beispiel für einen Antiporter ist der Transport von *ATP* über die Mitochondrienmembran. Dieser läuft erst ab, wenn die zweite Bindungsstelle ein Molekül *ADP* gebunden hat (Saier 2000).

Transportproteine weisen eine Substrat-Spezifität auf. Sie können mehrere Substrate akzeptieren, wie es für das P-Glycoprotein beschrieben ist (Tiberghien und Loor 1996) oder einen hohen Substratspezifität besitzen, wie der Gallensäuretransporter Asbt (Craddock et al. 1998).

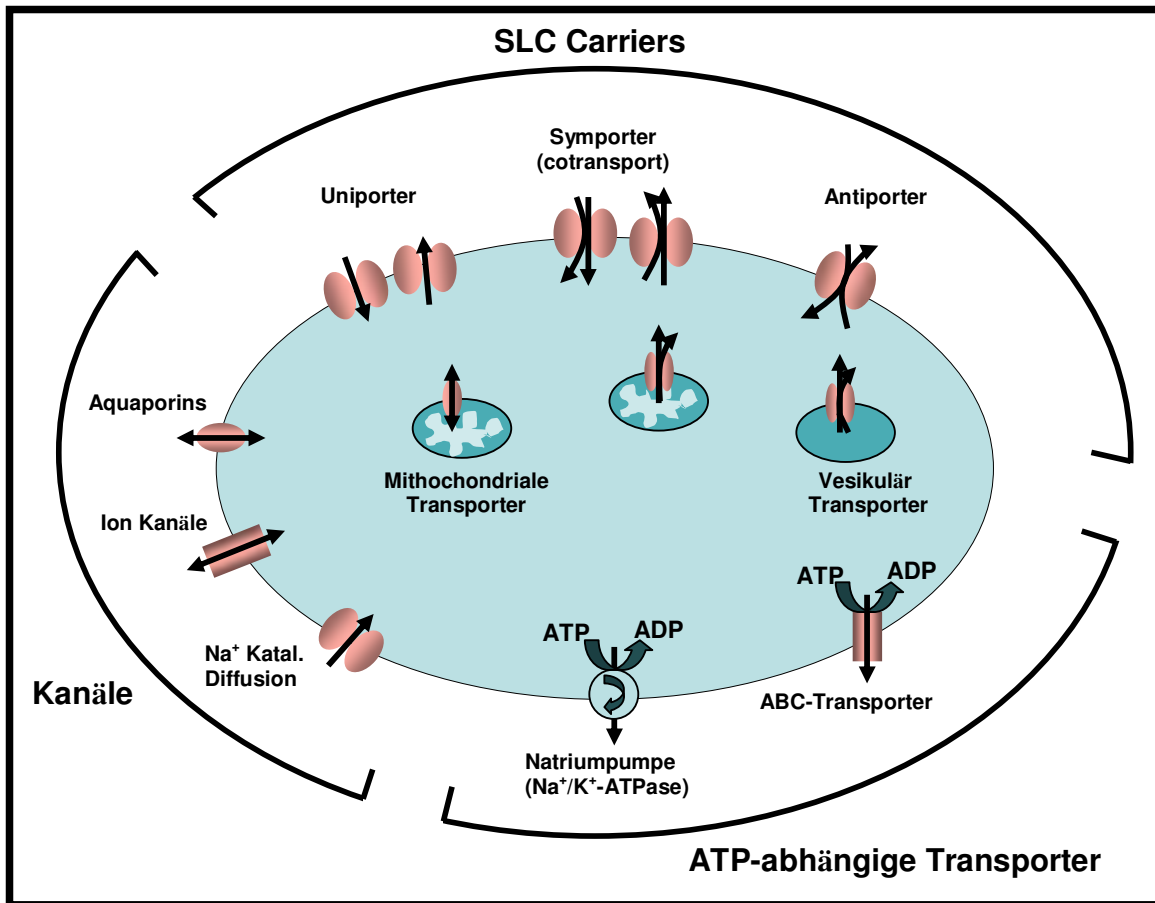


Abb. 3: Mögliche Membrantransportsysteme in einer biologische Zelle. Solute Carriers (SLC) und non-SLC-Transporter können auf der Zelloberfläche bzw. der Plasmamembran oder in intrazellulären Kompartimenten exprimiert werden (modifiziert nach Hediger et al. 2004).

## 2.5 Die Superfamilie der Solute Carrier (SLC)

Unter dem Begriff der SLC-Transporter wurden von dem Human Gene Nomenclature Committee (HGNC) der Human Genome Organisation (HUGO) verschiedene Transporterfamilien in einer Superfamilie zusammengefasst. SLC-Transporter umfassen passive Transporter sowie ionengekoppelte Symporter und Antiporter, welche entweder in der Zellmembran oder intrazellulär sitzen. Die Superfamilie besteht aus 46 Familien, die 360 klonierte Gene von Menschen, Ratte und Maus (Hediger et al. 2004) enthalten. Wenn neu klonierte Transporter mindestens 20-25 % Sequenzhomologie zu bereits bekannten Mitgliedern dieser Familie aufweisen, werden sie der gleichen SLC-Familie kategorisiert. Die Bezeichnung jedes Transportergens beginnt dabei mit dem Symbol SLC gefolgt von der Nummer der jeweiligen Transporterfamilie.

Die bekannten SLC-Familien werden in der Tabelle 3 gezeigt. Jedes einzelne Transportergen wird innerhalb jeder Familie chronologisch zur Erstklonierung durchnummeriert. Dabei steht zwischen der Gennummer und dem Symbol der Transporterfamilie ein „A“, um die Zahlenfolge zu unterbrechen (z.B. SLC2A4) (Hediger et al. 2004).

Da Transporter entweder als ein potentiell neues Drug-Target oder als Drug-Liefersysteme verwendet werden können, sind sie von pharmazeutischem Interesse. Kürzlich wurden die Familien SLC6 und SLC10 als Drug-Target erkannt (Kramer et al. 1992; Petzinger et al. 1995; Root et al. 1995; Kramer und Wess 1996; Chen et al. 2004). SLC-Transporter, die ausschließlich an der Blut-Hirn-Schranke exprimiert werden, sind als Drug-Liefersystem (delivery) verwendet worden (Hediger et al. 2004).



Tab. 3: Liste der SLC-Transporterfamilien, entsprechend dem HUGO Nomenclature Committee (Bioparadigms™ ([www.bioparadigms.org/slc/menu.asp](http://www.bioparadigms.org/slc/menu.asp)); Hediger et al. 2004).

The Solute Carrier Familien		Nummer des Gens
SLC1	The high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family	7
SLC2	The facilitative GLUT transporter family	14
SLC3	The heavy subunits of the heteromeric amino acid transporters	2
SLC4	The bicarbonate transporter family	11
SLC5	The sodium glucose cotransporter family	12
SLC6	The sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family	20
SLC7	The cationic amino acid transporter/glycoprotein-associated amino-acid transporter family	14
SLC8	The Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchanger family	3
SLC9	The Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger family	11
SLC10	The sodium bile salt cotransport family	7
SLC11	The proton coupled metal ion transporter family	2
SLC12	The electroneutral cation-Cl cotransporter family	9
SLC13	The human Na <sup>+</sup> -sulfate/carboxylate cotransporter family	5
SLC14	The urea transporter family	2
SLC15	The proton oligopeptide cotransporter family	4
SLC16	The monocarboxylate transporter family	14
SLC17	The vesicular glutamate transporter family	8
SLC18	The vesicular amine transporter family	3
SLC19	The folate/thiamine transporter family	3
SLC20	The type-III Na <sup>+</sup> -phosphate cotransporter family	2
SLC21/ SLC0	The organic anion transporting family	20
SLC22	The organic cation/anion/zwitterion transporter family	18
SLC23	The Na <sup>+</sup> -dependent ascorbic acid transporter family	4
SLC24	The Na <sup>+</sup> -(Ca <sup>2+</sup> -K <sup>+</sup> ) exchanger transporter family	6
SLC25	The mitochondrial carrier family	46
SLC26	The multifunctional anion exchanger family	11
SLC27	The fatty acid transporter protein family	6
SLC28	The Na <sup>+</sup> -coupled nucleoside transport family	3
SLC29	The facilitative nucleoside transporter family	4
SLC30	The zinc efflux family	10
SLC31	The copper transporter family	2
SLC32	The vesicular inhibitory amino acid transporter family	1
SLC33	The acetyl-CoA transporter family	1
SLC34	The type-II Na <sup>+</sup> -phosphate cotransporter family	3
SLC35	The nucleoside-sugar transporter family	23
SLC36	The proton-coupled amino-acid transporter family	4
SLC37	The sugar-phosphate/phosphate exchanger family	4
SLC38	The System A and N, sodium-coupled neutral amino acid transporter family	6
SLC39	The metal ion transporter family	14
SLC40	The basolateral iron transporter family	1
SLC41	The MgtE-like magnesium transporter family	3
SLC42	The Rh ammonium transporter family	3
SLC43	The Na <sup>+</sup> -independent, system-L-like amino acid transporter family	3
SLC44	Choline-like transporter family	5
SLC45	Putative sugar transporter family	4
SLC46	Heme transporter family	3

### 2.5.1 Die Solute Carrier-Familie 10 (SLC10)

Die Transporterfamilie SLC10 bildet eine der 46 bisher etablierten *Solute Carrier (SLC)* Transporter-Familien. Sie wird in der Literatur bisher als die Familie der Natrium-abhängigen Gallensäuretransporter bezeichnet und enthält die beiden Gallensäuretransporter NTCP ( $\text{Na}^+$ /taurocholate cotransporting polypeptide) und ASBT (apical sodium-dependent bile salt transporter). Beide vermitteln einen Natriumabhängigen Transport konjugierter und unkongjugierter Gallensäuren und sind entscheidend an der Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren beteiligt. Seit 2004 wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie vier neue Mitglieder dieser Transporterfamilie kloniert und charakterisiert (Geyer et al. 2006). Sie wurden als P3 (SLC10A3), P4 (SLC10A4), P5 (SLC10A5), Sodium-dependent Organic Anion Transporter (SOAT; SLC10A6) und P7 (SLC10A7) bezeichnet (Tab. 4; Geyer et al. 2006; Hagenbuch und Dawson 2004).

Tab. 4: Mitglieder der SLC10-Familie. Aufgeführt sind nur die humanen Gene.

Gene	Protein	Expression	Substrate	Chr.	Datenbank Nr.
SLC10A1	NTCP	Leber (basolaterale Membran), Pankreas (Tubuli)	Gallensäuren, sulfatierte Steroide	14q24	NM_003049
SLC10A2	ASBT	Ileum (apikale Membran), Niere (proximaler Tubulus), Cholangiozyten (apikale Membran)	Gallensäuren	13q33	NM_000452
SLC10A3	P3	Ubiquitär	Unbekannt	Xq28	NM_019848
SLC10A4	P4	Cholinerge Neurone	Unbekannt	4p12	NM_152679
SLC10A5	P5	Leber, Niere	Unbekannt	8q21	NM_001010893
SLC10A6	SOAT	Brustdrüse, Hoden, Plazenta, Nebenniere	Sulfatierte Steroide	4q21	NM_197965
SLC10A7	P7	Herz, Niere, Leber, Gehirn, Plazenta	Unbekannt	4q31.21	AK075364

P4 wurde spezifisch in cholinergen Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems nachgewiesen (Geyer et al. 2008). P5 wird stark in Leber und Niere exprimiert und ist dort vermutlich am Transport von Gallensäuren und Arzneistoffen beteiligt (Fernandes et al. 2007); P7 zeigt eine hohe phylogenetische Verwandtschaft zu bakteriellen Proteinen und ist möglicherweise das Ursprungsgen der gesamten SLC10-Familie (Godoy et al. 2007).

### 2.5.2 Der natriumabhängige Steroidsulfattransporter SOAT (SLC10A6)

Vor 5 Jahren wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie ein völlig neuer Transporter der SLC10-Familie kloniert und als Sodium-dependent Organic Anion Transporter (SOAT/SLC10A6) bezeichnet (Geyer et al. 2004). SOAT/Soat von Mensch, Ratte und Maus bestehen aus 370-377 Aminosäuren und besitzen ein Molekulargewicht von 40.3-41.2 kDa. In seiner Länge ist er damit sehr ähnlich zu NTCP/Ntcp (349-362 Aminosäuren) und ASBT/ Asbt (348 Aminosäuren). SOAT hat eine höhere Proteinsequenzübereinstimmung/Ähnlichkeit (similarity) zu ASBT (42 %/70 %) als zu NTCP (33 %/63 %; Abb. 4). Darüber hinaus sind SOAT und ASBT die phylogenetisch am nächsten verwandten Transporter der SLC10-Familie (Geyer et al. 2006). SOAT transportiert im Gegensatz zu NTCP und ASBT keine Gallensäuren und ist daher ein außergewöhnliches Mitglied der SLC10-Familie. SOAT transportiert aber spezifisch die sulfatierten Steroide E<sub>1</sub>S, DHEAS und PREGS (Geyer et al. 2004 und 2007). Aufgrund dieser Transportfunktion kommt dem SOAT vermutlich eine wichtige Rolle beim Transport sulfatierter Steroide in endokrinologisch relevanten Geweben wie Brust, Hoden, Plazenta und Nebennieren zu.

SOAT wird sehr niedrig in Gehirn, Dickdarm, Dünndarm, Niere, Leber, Eierstock, Prostata, Milz, und Thymus exprimiert. Im Gegensatz dazu wird SOAT im menschlichen Hoden hoch exprimiert, bezogen auf das mRNA Niveaus 678mal höher als im Gehirn, dem Gewebe mit der niedrigsten SOAT Expression. Eine relativ hohe Expression wurde auch in der menschlichen Plazenta und Bauchspeicheldrüse beobachtet; mittelgradig wird das Protein in Herz, Lunge, und Brustdrüse exprimiert (Geyer et al. 2007). Meerkamp et al. (2008) zeigten eine SOAT-Expression durch quantitative RT-PCR sowohl in gesundem Brustgewebe als auch entartetem Mammatumorgewebe und wiesen gleichzeitig die Expression der STS in diesen Geweben nach. Diese Koexpression ermöglicht die funktionelle Zusammenarbeit der beiden Proteine im Konzept der Intrakrinologie.

SOAT transportiert die sulfatierten Steroide E<sub>1</sub>S ( $K_m$  12  $\mu$ M), DHEAS ( $K_m$  28,7  $\mu$ M) und PREGS ( $K_m$  11,3  $\mu$ M) (Geyer et al. 2007), welche als biologisch/hormonell inaktive Steroidkonjugate im Plasma zirkulieren.

Der Transport über SOAT ist abhängig von der Anwesenheit von Natrium im Extrazellulärmedium (Geyer et al. 2007).

Transporter für Steroidsulfate sind entscheidend für deren gewebspezifische Aufnahme verantwortlich und spielen damit nicht nur eine wichtige physiologische Rolle in der Synthese von Estrogenen in der menschlichen Plazenta, sondern auch von Estrogenen und Androgenen in anderen peripheren Geweben.

Pathophysiologisch scheint der Steroidsulfattransport beim hormonabhängigen Mammakarzinom von Bedeutung zu sein. Importierte Steroidsulfate können hier intrazellulär

in hormonell wirksame Estrogene umgewandelt werden und intrakrin eine proliferative Wirkung auf das Tumorgewebe ausüben (Suzuki et al. 2005). SOAT kommt in Brustdrüsengewebe vor und wird in entartetem Gewebe möglicherweise vermehrt gebildet (Meerkamp et al. 2008).

ASBT	1	MNDPNSCVDNATVCSGASCVVPESNFNNILSVVLSTVLTILLALVMFSMGONVEIKKFLG
SOAT	1	MRANCSSSSACPANSSEEEELPVGLEVHGNNLELVETVVSTVMMGLMFSLGCSVEIRKIWS
NTCP	1	-----MEAHNASAPFNFTLPPNFGRPTDLALSVILVEMFFIMLSLGCTMEFSKIKK
ASBT	61	HIKRPWGICVGFELCQFGIMPLTGFIILSVAFDILPLQAVVVLIGCCPGGTASNILAYWVD
SOAT	61	HIRRPWGIAVGLLCQFGLMPETAYLLAISFSLKPVQAIIVLIMGCCPGGTISNIFTFWVD
NTCP	54	HLWKPKGLAIALVAQYGIMPLTAFVLGKVERLKNIEALAILVCGCSPGGNLSNVFSLAMK
ASBT	121	GDMDLSVSMTTCSTLLALGMMPLCLLIYTKMWVD-SGSIVIPYDNIGTSLVALVVPVSIQ
SOAT	121	GDMDLSISMTTCSTVAALGMMPLCIYLYTWSWSL-QQNLTIPIYQNIIGITLVCLTIPVAFQ
NTCP	114	GDMNLSIVMTTCSTFCALGMMPLLLYIYSRGIYDGDLDKDKVPYKGIIVISLVLVLPCTIG
ASBT	180	MFVNHKWPKAKIILKIGSTAGAILIVLIAVVGGLIYQS--AWITAPKLWIIGTIFPVAG
SOAT	180	VYVNYRWPKQSKIILKIGAVVGGVLLLVAVAGVVLAKG--SWNSDITLLTISFIFPLIG
NTCP	174	IVLKSRRPOYMRVYIKGMIHILLCSVAVTVLSAINVGKSIMTAMTPLLIIATSSLMPIG
ASBT	238	YSLGFLLRITAGLPWYRCRTVAFETGMONTQLCSTIVQLSFTPEELNVVFTFPLIYSIFQ
SOAT	238	HVTGFLALFTHQSWQRCRTISLETGAQNIQMCITMLQLSFTAELVQMLSFPLAYGLFQ
NTCP	234	FLGCVLSAIFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAEPPEVIGPLFFFPPLLYMIFQ
ASBT	298	LAFAAIFLGFYVAYKK----CHGKNK---AEIPESKENGTEPES-SFYKAN--GGFQDDE
SOAT	298	LIDGELIVAAVQTYKRRLLKNKHGKKNSGCTEVCHTRKSTSSRETNAFLEVNEEGAITPGP
NTCP	294	LGECILLIATFWCYEK---FKTPKDK---TKMIYTAATTEETIPCALGNCTYKGEDCSPC
ASBT	348	K-----
SOAT	358	PCPMDCHRALEPVGHITSCE
NTCP	348	TA-----

Abb. 4: Aus der DNA-Sequenzabgeleitete Aminosäure-Sequenzen des menschlichen SOAT (SLC10A6) in Alignment mit menschlichem NTCP (SLC10A1) und ASBT (SLC10A2). Identität der Aminosäuren wird mit der schwarzen Schattierung gezeigt, Aminosäure-Ähnlichkeiten werden im grau hervorgehoben (nach Geyer et al. 2007).

## 2.6 Zelllinien T47D und MCF7

Ein etabliertes Modell zur Untersuchung der Proliferation hormonabhängiger Mammakarzinome bilden die humanen Krebszelllinien T47D (Evans et al. 1993; Pasqualini et al. 1994) und MCF7 (Evans et al. 1993; Pasqualini et al. 1994; James et al. 2001), für die eine intrakrine Estrogen-Synthese belegt ist. Die Aufnahme von DHEAS in menschliches Brustgewebe wurde von Thijssen et al. (1986) beschrieben und in diesem Artikel wurde ein Metabolismus des DHEAS zu DHEA und Androstendiol postuliert. Auch für die Mammatumorzelllinie MCF7 ist ein direkter Steroidsulfat-Transport gezeigt worden (Nozawa

et al. 2005). Für die Linien T47D und MCF7 wurde gezeigt, dass für extrazellulär angebotenes DHEAS (Le Bail et al. 2002) ein estrogener Effekt in MCF7- und T47D-Zellen nachweisbar ist (Le Bail et al. 1998).

Die als MCF7 bezeichnete humane Mammakarzinom-Zelllinie wurde 1973 aus einem pleuralen Erguß einer Patientin mit metastasierendem Mammakarzinom gewonnen (Soule 1973). MCF7 ist eine gut differenzierte Zelllinie und stellt ein etabliertes *in vitro* Testsystem dar. Sie ist die am Besten charakterisierte steroidhormonrezeptorpositive Mammakarzinom-Zelllinie.

Beide genannte Zelllinien exprimieren Estrogen- und Progesteronrezeptoren sowie die Enzyme für eine intrakrine Synthese aktiver Estrogen ausgehend von E<sub>1</sub>S und DHEAS (Pasqualini et al. 1989; Najid und Habrioux 1990; Saeki et al. 1999; Maggiolini et al. 2001). Es ist bereits gut dokumentiert, dass die Proliferation von T47D und MCF7 Zellen nicht nur durch Inkubation mit E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> und DHEA, sondern auch mit E<sub>1</sub>S und DHEAS signifikant stimuliert wird (Pasqualini et al. 1990; Najid und Habrioux 1990; Le Bail et al. 1998; Maggiolini et al. 1999; Billich et al. 2000; Morris et al. 2001; Schmitt et al. 2001; Nozawa et al. 2004-A; Nozawa et al. 2005).

Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung dieser beiden Zelllinien liegt darin, dass die Zellen unterschiedliche STS Aktivitäten aufweisen (Tab. 5).

Aus diesem Grund wurden diese Zelllinien als Modell für die Untersuchung der Steroidsulfat-Wirkung auf Mammatumore und deren pharmakologischer Beeinflussung eingesetzt.

Tab. 5: Aktivitäten der STS in humanen Zellen, Literaturangaben.

<b>Zelllinie</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Enzymaktivität [pmol/mg Protein/min]</b>	<b>Autor</b>
MCF7	Mammakarzinom, Primärtumor	19	Evans et al. (1993)
		87	Pasqualini et al. (1994)
		140	James et al. (2001)
T47D	Mammakarzinom,	80	Evans et al. (1993)
	Metastase	878	Pasqualini et al. (1994)

## 2.7 Mammatumore in der Veterinärmedizin (Hund und Katze)

Mammatumore gehören zu den häufigsten Tumoren beim Hund und machen 25-50 % von allen Tumoren in dieser Spezies aus. Das durchschnittliche Alter für die Erkrankung an Mammatumoren liegt zwischen 6 und 10 Jahren. Bei der Katze sind Mammatumoren seltener als bei Hunden. Sie machen etwa 10 % aller nicht lymphatischen Tumore der Katze aus, wobei das durchschnittliche Erkrankungsalter bei 10 Jahren liegt (Yamashita et al. 2001; Millanta et al. 2005). Auch Moe (2001) berichtet, dass überwiegend ältere Hündinnen an

Mammatumoren erkranken. Er beobachtete, dass die Inzidenz ab dem siebten Lebensjahr deutlich zunimmt und ihren Höhepunkt mit 10 bis 14 Jahren hat. Das Risiko, an Mammatumoren zu erkranken, ist für die verschiedenen Hunderassen unterschiedlich. Schäferhunde, Dackel, Pudel und Spanielrassen erkranken überproportional häufig (Moe 2001).

Der Anteil an bösartigen Mammatumoren ist bei der Katze mit 86 % höher als beim Hund (42 %) und die Histopathologie von Mammatumoren der Katze ist dem menschlichen Brustkrebs näher (Perez-Alenza et al. 2004).

Eine bedeutsame Rolle bei der Tumorentstehung spielen offenbar endokrine Hormone. Diese Annahme basiert auf dem beobachteten schützenden Effekt der Ovariectomie und dem verstärkenden Effekt durch wiederholte Estrogen- oder Progesterongaben. Diese Annahme der Beteiligung von Steroidhormonen an der Mammatumorgenese bei Hunden und Katzen wird bekräftigt durch das sporadische Auftreten von Brustdysplasien und –neoplasien bei Katzen, die mit Progestagenen behandelt wurden (Misdorp 1991; Hayden et al. 1989). Ebenso kommt es nach Kastration oder Testosterongabe zur zeitweisen Rückbildung von Mammatumoren bei Hund und Katze (Anderson et al. 1966).

Hündinnen, die vor dem ersten Östrus kastriert wurden, haben ein etwa 0,5 %iges Risiko an Mammatumoren zu erkranken. Nach dem ersten Östrus steigt das Risiko auf 8% und nach dem zweiten und weiteren Östren vor dem Kastrieren steigt das Risiko auf 26 %. Bei einer Kastration im Alter von 2,5 Jahren besteht kein unterschiedliches Tumorrisiko zu nicht kastrierten Hündinnen (Priester 1979).

Maligne Mammatumoren der Hündinnen weisen in verschiedenen Studien 50 – 88 % Estrogen- oder Progesteronrezeptoren auf (Rutteman et al. 1988; Geraldles et al. 2000).

Illera et al. (2006) zeigte in seiner Untersuchung bei Hunden erhöhte Konzentrationen aller berücksichtigten Hormone (DHEA, Androstenedion, Testosterone, E<sub>2</sub> und E<sub>1</sub>S) in bösartigen Mammatumoren, besonders in entzündlichen. Die Niveaus von DHEA und E<sub>1</sub>S im Serum und in Gewebehomogenaten waren zwei- oder dreimal höher in entzündlichen Mammakarzinomen als in den anderen Gruppen.

### **3 Fragestellungen**

Pathophysiologisch scheint der Steroidsulfattransport beim hormonabhängigen Mammakarzinom eine bedeutende Rolle zu spielen. Importierte Steroidsulfate können nach Aufnahme in sowohl gesunde weibliche Mammazellen als auch Mammakarzinomzellen intrazellulär in hormonell wirksame Estrogene umgewandelt werden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, folgende Fragestellung zu beantworten:

- Spielt der Sodium-dependent Organic Anion Transporter (SOAT/SLC10A6) für die Proliferation Estrogen-abhängiger Mammatumor-Zelllinien eine Rolle unter dem Einfluss von Steroidsulfaten?

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien, Medien, Reagenzien, Enzyme und Kits sowie deren Bezugsquellen

2-Propanol	Roth Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid Dihydrat, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth Karlsruhe
Cholinchlorid	Sigma, Schnelldorf
Dextran-Charcoal, DCC	Sigma
DHEAS	Sigma, Steinheim
Dialysiertes FKS	PAA, Cölbe
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA, Dinatriumsalz	Serva-Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Estradiol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Estron-3-sulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol (> 99,8 %), EtOH abs.	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fugene6®	Roche, Mannheim
FKS (Fetales Kälberserum)	Sigma, Deisenhofen
F-12 Nutrient Mixture (HAM)	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Genitacin G418	Invitrogen, Karlsruhe
Gene Ruler™ DNA Ladder Mix	MBI, Fermentas St. Leon-Roth
Glycerin	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Augsburg



Hepes	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
KOH	Merck, Darmstadt
Lipofectamine <sup>®</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofetamine2000 <sup>®</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamine (200 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Metafectene <sup>®</sup>	Biontex, Martinsried Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Mowiol	Hoechst, Frankfurt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
NaCl Natriumchlorid,	Roth, Karlsruhe
Na-EDTA	Serva, Heidelberg
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva-Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
Nitrozellulosemembranfilter (0,45 µm)	Schleicher _ Schuell, Dassel
NZ-Amin-Casein-Hydrolysat	Difco, Augsburg
OPTIMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Poly-L-Lysin hydro bromide	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNAse	Sigma, Schnelldorf
SOC Medium	GibcoBrl, Paisley, Schottland
Sodium-Dodecylsulfat (SDS) S	Serva, Heidelberg
Stickstoff, flüssig,	N2 Messer, Griesheim
Szinzillator (Rotiszint 22 eco)	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Fluka, Buchs, Schweiz
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching

Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	ICN-Biomedicals, Inc., Aurora Ohio
Triton X-100	Serva-Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Yeast Extract	Difco, Detroit, USA
Zellkulturbedarf	Sarstedt, Nümbrecht
	Sigma, Deisenhofen

Alle weiteren und hier nicht aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in p.a.-Qualität von folgenden Firmen bezogen: VWR International/Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Sigma, Taufkirchen.

#### 4.1.2 Kommerziell erhältliche Kits

High Pure® PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics, Penzberg
PeqGOLD RNA Pure™	Peg Lab Biotechnologie GmbH, Erlangen
First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas, St Leon-Roth
QIAEX II® Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN® Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep® Plasmid Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit®	Roche Diagnostics, Penzberg

#### 4.1.3 Radioaktiv-markierte Chemikalien

Substanz	Spezifische Aktivität	Konzentration	fmol / dpm
[ <sup>3</sup> H]DHEAS *	1,0 mCi/ml, 74,0 Ci/mmol	13,5 µM	0,0061426
[ <sup>3</sup> H]Estron-3-sulfat*	1,0 mCi/ml, 57,3 Ci/mmol	17,5 µM	0,0079328
[methyl- <sup>3</sup> H]Thymidine**	1,0 mCi/ml, 79,0 Ci/mmol	12,7 µM	0,0057537

Radioaktiv markierten Substanzen wurden \*von PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA, USA und \*\* von GE Healthcare Amersham, UK bezogen.

#### 4.1.4 Geräte

##### Analysewaagen:

AE 260 Delta Range

Precisa 3000C-6000D

Autoklav Sanoclav

Brutschrank CO<sub>2</sub> Inkubator

Elektrophorese-Kammern

- 14,5 x 6,5 cm

- 35,5 x 11,0 cm

Fluoreszenzmikroskop DM6000B

S/W Kamera DFC350FX

Flüssigkeitsszintillationszähler Wallac 1409

Elektroporator, Bio-Rad Gene Pulser  
XCell®

G24 Environmental Incubator shaker

Gelschlitten Werkstatt

- 7,5 x 5 cm

- 12 x 18 cm

Imagemaster VDS

Microplate Reader

MJ Mini Gradient Thermal Cyclor

Perkin-Elmer GeneAmp Cyclor Typ 2400

Photometer DU-64

Quarzdestille Typ Bi 18 Nr. H2

Quarzküvette, Schichtdicke 10 mm

Spannungsquelle (max. 200 mA, 1 kV, 150 W)

SpeedVac SPD111V

Spannungsgeber (0-200 mA, 1 kV, 150 W)

Sterilwerkbank, Clean Air, Typ DLF-REL 6

Schüttler, New Brunswick Scientific

UV-Transilluminator

Vortex VF 2

Waage (0,01-500 g)

Wasserbad

##### Zentrifugen:

- Eppendorf Centrifuge 5417R

- Megafuge 1.0

Mettler-Toledo, Gießen

DAK-Oerlikon, Zürich, Schweiz

Wolf, Geislingen

Heraeus, Hanau

Werkstatt MZI, Gießen

Leica Mikrosysteme, Bensheim

Pharmacia, Freiburg

Bio-Rad, München

New Brunswick Scientific, Edison, USA

MZI, Gießen

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Bio-Rad, München

Bio-Rad, München

Perkin-Elmer, Weiterstadt

Beckmann, München

Heraeus-Schott, Hanau

Hellma, Mülheim/Baden

Werkstatt des MZI, Gießen

Savant, Holbrook, NY, USA

Werkstatt MZI, Gießen

Heraeus, Hanau

EDISON, N. J., USA

Bachofer, Reutlingen

Janke und Kunkel, Staufen

Mettler-Toledo, Gießen

Memmert, Schwalbach

Eppendorf, Hamburg

Heraeus, Hanau

- Sorvall Kühlzentrifuge RC5C Rotor HB4    Sorvall/Du Pont, Bad Homburg
- Tischzentrifuge 5415D    Eppendorf, Hamburg
- TZ-25 Centrifuge    Beckman Coulter
- Vakuumzentrifuge Speed Vac SC 110    Savant, Farmingdale, USA

#### 4.1.5 Prokaryotische und eukaryotische Zellstämme

Name	Charakterisierung
<i>E.coli</i> Strain HB101	F <sup>-</sup> , mcrB, mrr, hsdS20(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>recA</i> 13, <i>leuB</i> 6, <i>ara</i> -14, <i>proA</i> 2, <i>lacY</i> 1, <i>galK</i> 2, <i>xyl</i> -5, <i>mtl</i> -1, <i>rpsL</i> 20(Sm <sup>r</sup> ), <i>supE</i> 44, » <sup>-</sup>
HEK293	Human embryonic kidney cells 293 (Invitrogen, Karlsruhe)
MCF7	Adenokarzinomzellen der Brustdrüse, pleurale Effusion (Evans et al. 1993; Pasqualini et al. 1994; James et al. 2001)
T47D	Zellen von duktalem Karzinom der Brustdrüse, pleurale Effusion (Evans et al. 1993; Pasqualini et al. 1994)

#### 4.1.6 Enzyme

Verwendete Restriktionsenzyme und Ihre Erkennungssequenzen

Enzym	Erkannte Schnittstelle	Bezugsquelle
<i>Xba</i> I	5'-T <sup>^</sup> A C T A G A-3' 3'-A G A T C <sup>^</sup> A T-5'	New England Biolabs
<i>Hind</i> III	5'-A <sup>^</sup> A G C T T-3' 3'-T T C G A <sup>^</sup> A-5'	New England Biolabs
<i>Sma</i> I	5'-C C C <sup>^</sup> G G G-3' 3'-G G G <sup>^</sup> C C C-5'	New England Biolabs
<i>Bgl</i> II	5'-A <sup>^</sup> G A T C T -3' 3'-T C T A G <sup>^</sup> A-5'	New England Biolabs
<i>Sa</i> I	5'-G <sup>^</sup> A T C G A C -3' 3'-C A G C T <sup>^</sup> G-5'	New England Biolabs
<i>Kpn</i> I	5'-G G T A C <sup>^</sup> C-3' 3'-C <sup>^</sup> C A T G G-5'	New England Biolabs

DNA-Polymerasen	<i>Taq</i> DNA Polymerase, Fermentas
Reverse Transkriptase	First Strand cDNA Synthesis Kit, MBI Fermentas
Ligasen	T4 DNA Ligase, Fermentas
	Rapid DNA Ligation Kit, Roche Diagnostics
Sonstige Enzyme	DNA-Polymerase I Large Fragment (Klenow Fragment), New England Biolabs

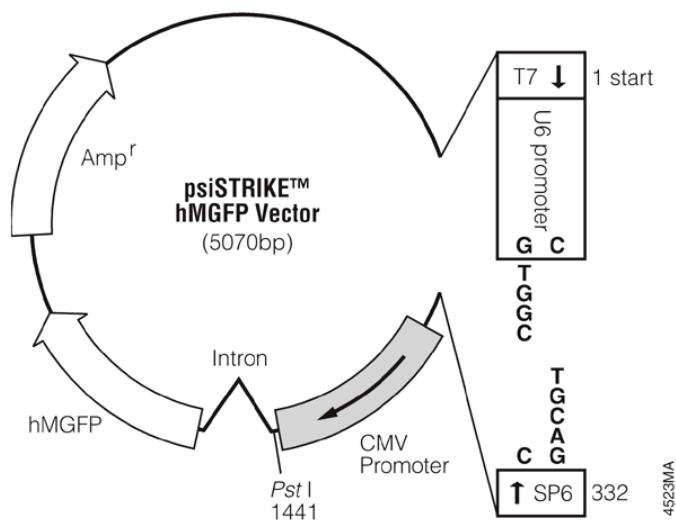
#### 4.1.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von Operon Biotechnologies GmbH Köln bezogen.

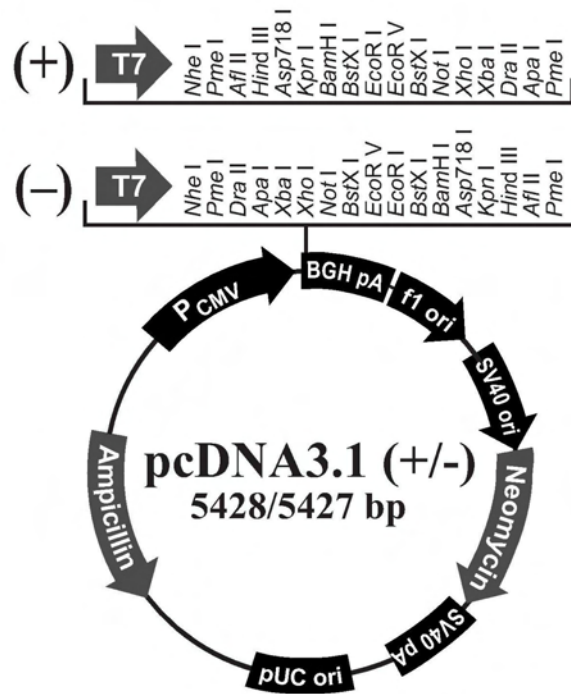
<b>hSOAT-Kassette f</b>	5'-TTTGCCTGCTTCGCGATGTACGG-3'
<b>hSOAT-Kassette r</b>	5'-ATAGAGCCCACCGCATCCCCAGC-3'
<b>shRNA-Kassette f</b>	5'-GACGTTGTAAAACGACGGCC-3'
<b>shRNA-Kassette r</b>	5'-ATGACCATGATTACGCCAAGC-3'
<b>hSOAT-Kassette f</b>	5'-CAGATGTTGAGTTTCCCACTG-3'
<b>hSOAT-Kassette r</b>	5'-CTACTTATCGTCGTCATCCTTG-3'

#### 4.1.8 Plasmide

psiSTRIKE™ hMGFP (Promega)



pcDNA3.1(+) (Invitroge)



5428 Bp Gesamtlänge, CMV-Promotor, BGH Poly A, FRT Site, Neor, Ampr, pUC origin, MCS (*NheI*, *PmeI*, *AflII*, *HindIII*, *Asp718I*, *KpnI*, *BamHI*, *BstXI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *BstXI*, *NotI*, *XhoI*, *XbaI*, *DraII*, *ApaI*, *PmeI*).

```

      enhancer region (3' end)
689  CATTGACGTC AATGGGAGTT TGTTTTGGCA CAAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTCG
      CAAT
749  TAACAACTCC GCCCCATTGA CGCAAATGGG CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT
      3' end of hCMV
809  AAGCAGAGCT CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTTAC TGGCTTATCG AAATTAATAC
      T7 promoter/primer binding site
869  GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTGGCTA GCGTTTAAAC TTAAGCTTGG TACCGAGCTC
      BamH I
929  GGATCCACTA GTCCAGTGTG GTGGAATTCT GCAGATATCC AGCACAGTGG CGGCCGCTCG
      Xba I Dra II Apa I Pme I
989  AGTCTAGAGG GCCCGTTTAA ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC
      pcDNA3.1/BGH reverse priming site
1049 CATCTGTTGT TTGCCCTCC CCCGTGCCTT CCTTGACCCT GGAAGGTGCC ACTCCCCTG
      BGH poly (A) site
1109 TCCTTTCTTA ATAAATGAG GAAATTGCAT
  
```

## 4.2 Methoden

Um die Bedeutung des SOAT für die E<sub>1</sub>S-abhängige Proliferation zu analysieren, sollte durch gentechnische Methoden die Expression des SOAT in Estrogenrezeptor-positiven Zelllinien zum einen verstärkt und zum anderen unterdrückt werden. Eine verstärkte Expression lässt sich durch die Transfektion der Zelllinien mit DNA erreichen, die für den SOAT kodiert (cDNA) und unter der Kontrolle eines starken Promotors steht. Die verstärkte Expression lässt sich funktionell leicht durch die Messung der Aufnahme von radioaktiv markierten sulfatierten Steroiden nachweisen. Zeigen die Zellen eine vermehrte Expression, nehmen sie mehr sulfatierte Steroide auf als die nicht transfizierten Kontrollen. Um eine stabile Transfektion zu erreichen, wird die Expressionskassette des SOAT mit einer Resistenz gegen das Antibiotikum Neomycin in einem Vektor vereinigt. So lassen sich nach der Transfektion die transfizierten Zellen durch eine Behandlung mit Neomycin oder Geneticin selektionieren. Auf Dauer überleben nur die Zellen, die den Vektor in ihr Genom integriert haben.

Eine Unterdrückung der Expression lässt sich durch die Ausnutzung der RNA interference (RNAi) mit doppelsträngiger RNA erreichen. Von eukaryontischen Zellen wird keine doppelsträngige RNA gebildet. Taucht doppelsträngige RNA in einer Zelle auf, wird sie von einem Enzym in kurze Fragmente geschnitten. Ein weiteres Enzym verwendet diese Fragmente als Matrize, um unter der mRNA, die in der Zelle enthalten ist, komplementäre Moleküle zu erkennen, um diese gezielt abzubauen. Bringt man Sequenzabschnitte des Gens, das man unterdrücken will, in diesem Fall des SOAT, in Form von doppelsträngiger RNA in die Zellen, so werden durch die RNAi die mRNA des SOAT abgebaut und die Expression dadurch unterdrückt.

Soweit nicht anders angegeben, wurden die hier beschriebenen Verfahren nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

## 4.2.1 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

#### Lösungen:

##### Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)

Tris 40 mM

EDTA 1 mM

pH 8,0 mit Na-Acetat eingestellt.

##### Lade-Puffer

Bromphenolblau 0,25 %

Xylencyanol 0,25 %

Glyzerin 30 %

##### Färbelösung

10 µg/ml Ethidiumbromid in H<sub>2</sub>O

Die Auftrennung der DNA-Banden erfolgte entsprechend ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld in einer Agarose-Gelelektrophorese. DNA wandert aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle in dem Agarosegel ist von ihrer Größe abhängig, da mit dieser die Reibung zunimmt. Je mehr Basenpaare das Molekül enthält, desto langsamer wandert es durch das Gel. Durch das Mitführen von DNA-Molekülen bekannter Länge können die Größen der untersuchten DNA Fragmente bestimmt werden. Es wurden 1 bis 2 %ige Agarose-Gele verwendet. Für ein einprozentiges Agarose-Gel wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht bis eine homogene Lösung entstanden ist. Diese wurde auf 50-60° C abgekühlt und in einen mit Klebestreifen abgedichteten Gelschlitten gegossen. Anschließend wurde der Kamm eingesetzt. Nach Erstarren des Gels wurden die Klebestreifen entfernt und der Schlitten in eine mit TAE-Puffer gefüllte Horizontalgelkammer eingesetzt. Der Kamm wurde kurz vor Probenauftrag entfernt.

Die DNA-Proben wurden 1:6 mit 6 x Ladepuffer gemischt und auf die Gele aufgetragen. Für die analytische Gelelektrophorese wurde soviel DNA eingesetzt, dass von den erwarteten Fragmenten jeweils 20-100 ng in der Lösung vorliegen. Als Marker wurde der Gene Ruler DNA Ladder Mix (MBI, Fermentas) eingesetzt. Dieser besteht aus Fragmenten von 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 Bp Länge. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 10 V/cm für 60 min, bzw. bis das Bromphenolblau



im Ladepuffer 2/3 des Gels durchlaufen hatte. Das Gel wurde anschließend durch 15 minütiges Einlegen in eine Lösung von 10 µg/ml Ethidiumbromid in H<sub>2</sub>O gefärbt, danach mit Wasser gespült und auf dem UV-Transilluminator „ImageMaster“ (Pharmacia Biotech) fotografiert.

#### 4.2.1.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA spezifisch an bestimmten Basensequenzen und ermöglichen so die Entstehung von DNA-Fragmenten mit glatten Enden oder einzelsträngigen Überhängen, sogenannte klebrige Enden. Um 1 µg Plasmid zu verdauen, wurden zwischen 5-10 U Enzym für eine Stunde bei 37° C eingesetzt. Hier wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer benutzt.

#### 4.2.1.3 Trennung von DNA-Fragmenten durch Gel-Extraktion

DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe lassen sich durch Gelelektrophorese auftrennen und anschließend Extraktion aus dem Agarosegel isolieren. Hierfür muss mehr DNA als in einer analytischen Gelelektrophorese eingesetzt werden, da bei der Extraktion Verluste entstehen. Nach der Auftrennung der Fragmente und Färben mit Ethidiumbromid wurden die gewünschte DNA-Banden unter UV-Licht erkannt und mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die Aufreinigung der DANN-Fragmente erfolgte mit dem QIAEX II® Gel Extraction Kit. Die gewonnene DNA-Lösung wurde bei –20° C gelagert.

#### 4.2.1.4 Ligation von DNA

Mit Hilfe einer DNA-Ligase wurden die DNA-Fragmente in einen Vektor eingefügt. Die Ligation führt zum Einbau eines DNA-Fragmentes (*insert*) in einen Vektor durch Bildung von Phosphordiesterbindungen, wenn die Enden kompatibel sind. Dies wird erreicht, indem die Fragmente und die *multiple-cloning-site* des Vektors mit Restriktionsenzymen geschnitten werden, die die gleichen Überhänge produzieren. Zur Ligation wurde das Rapid DNA Ligation Kit (Fermentas) eingesetzt, das die T4 DNA-Ligase verwendet.

#### 4.2.1.5 Die Herstellung chemokompetenter Bakterien (XL10Gold)

50 µl einer Gefrierkultur des Bakterienstammes *E.coli* (XL10 Gold) wurden in 10 ml LB-Medium bei 37° C unter Schütteln (225 rpm) über Nacht bebrütet. 2 ml dieser Vorkultur wurden in 200 ml LB-Medium überführt und bei 37° C/ 225 rpm für 2-3 h (bis zu einer OD<sub>600</sub>

von 0,5) kultiviert. Die Bakterienkultur wurde in sterilen Polypropylenröhrchen für 10 min bei 3500 x g und 4° C zentrifugiert und das Bakterienpellet wieder in 100 ml 100 mM MgCl<sub>2</sub> (4° C) resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und dann mit 20 x g bei 4° C zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in 100 ml 85 mM CaCl<sub>2</sub> mit Glycerin (4° C) aufgenommen. Die Bakterien wurden für 1 h auf Eis inkubiert und anschließend in Aliquots (850µl) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert.

#### **4.2.1.6 Die Herstellung elektrokompetenter Bakterien (HB101)**

40 mL LB wurden mit 2 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,9 bei 37° C geschüttelt. Der Ansatz wurde für 15 min in Eiswasser abgekühlt und für 15 min im vorgekühlten Rotor der Kühlzentrifuge bei 3500 x g und 4° C abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden in 5 ml ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Der Zentrifugenbecher wurde dann 5 ml ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und erneut für 15 min im vorgekühlten Rotor der Kühlzentrifuge bei 3500 x g und 4° C abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in 20 ml 15 % Glycerol resuspendiert. Die Suspension wurde erneut wie zuvor zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 0,5-1 ml 15 % Glycerol in ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und in 100 µl Aliquots in Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert.

#### **4.2.1.7 Klonierung der Vektoren**

##### **Expressionsvektor:**

Das Plasmid pcDNA3.1(+) ist ein 5428 Bp großer Expressionsvektor für eukaryotische Zellen. Mit diesem Vektor ist die Klonierung eines Gens von Interesse möglich. Für die Klonierung trägt das Plasmid ein Ampicillinresistenzgen. Die Expressionskassette besteht aus dem Cytomegalo-Virus-Promotor (P<sub>CMV</sub>) und dem polyA-Signal des Bovine Growth Hormone (BGHpA), zwischen denen sich eine multiple cloning site befindet. Über das Neomycin-Resistenzgen unter Kontrolle des SV40-Promotors ist eine stabile Transfektion von eukaryontischen Zellen möglich.

6

Der Restriktionsverdau von Insert und Vektor erfolgte mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Xba*I in einem Gesamtvolumen von 20 µl. 2 µg pcDNA3.1(+) und 6 µg pBluehSOAT wurden mit jeweils 10 U beider Endonukleasen für 2 h bei 37° C geschnitten. Anschließend wurden die geschnittene DNA auf einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 5), die Fragmente ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert. Für die Ligation wurde

das Rapid DNA Ligation Kit (Fermentas) eingesetzt (Tab. 6). Die Reaktion erfolgte bei RT für 1 h.

Tab.6: Ligations-Ansatz für Expression des SOAT

<b>Ligations-Ansatz [µl]</b>	<b>SOATF3</b>
2 x Rapid Ligation Puffer	2
pcDNA3.1(+) (50 ng/µl)	1
cDNA des SOAT-Flag (50 ng/µl)	3
H <sub>2</sub> O (Nuclease-frei)	12
T4 DNA-Ligase	2

### **RNAi-Vektor:**

Eine Unterdrückung der Expression des SOAT soll über einen short hairpin (sh) RNA-Vektor erreicht werden. Hierzu wurden verschiedene, 19-23 Nukleotide lange Sequenzabschnitte der cDNA des SOAT in Leserichtung, gefolgt von einem loop bildenden Spacer und der komplementären Sequenz des Abschnitts in den Vektor psiSTRIKE-hMGFP® (Promega) kloniert. Bei Transfektion in Zellen werden kurze RNA-Moleküle von diesen Sequenzen transkribiert, die spontan zu einer doppelsträngigen shRNA hybridisieren. Diese shRNA-Moleküle werden von dem RNAi-Komplex (RISC) gebunden, der die mRNA des SOAT dadurch spezifisch degradiert. Von diesen Sequenzen wurde über Bestimmung des RNAi-Effekts in stabil mit hSOAT transfizierten Zellen diejenige ausgewählt, die den größten Effekt ausübte. Dieser Vektor (SOAT2-RNAi) wurde bereits vom Institut zur Verfügung gestellt. Als Kontrollplasmid wurde eine Sequenz in psiSTRIKE-hMGFP® kloniert, die randomisiert die Basen der wirksamen shRNA enthält. Um eine stabile Transfektion zu ermöglichen, wurde zusätzlich ein Neomycin-Resistenzgen (PGK\_Neo<sup>R</sup>-Kassette) in den Vektor kloniert.

Die komplementären einzelsträngigen RNA-Oligonukleotide wurden nach Zusatz eines „annealing“-Puffers für 3 min bei 90° C denaturiert und bei 37° C für 15 min hybridisiert. Die siRNA wurden als definierte Stammlösung (als 1 µg/µl) verdünnt und mit dem linearisiert vorliegenden Vektor ligiert (Tab.7). Die gewonnenen Plasmide wurden als SOAT-RNAi und SOAT-RNAi-Kontroll bezeichnet.

### **Sequenz:**

RNAi-SOAT	f	5'-ACCGAAAGGATCTTGGAATTCATTCAAGAGATGAATTCCAAGATCCTTTCTTTTTC-3'
	r	5'-TGCAGAAAAAGAAAGATCTTGGAATTCATCTCTTTGAATGAATTCCAAGATCCTTT-3'
RNAi-Kontroll	f	5'-ACCGTACTATTGGAGCAGTAAATTCAAGAGATTTACTGCTCCAATAGTACTTTTTC-3'
	r	5'-TGCAGAAAAAGTACTATTGGAGCAGTAAATCTCTTGAATTTACTGCTCCAATAGTA-3'

Tab.7: Ligations-Ansatz für knock down des SOAT

Ligations-Ansatz [µl]	SOAT-RNAi	SOAT-RNAi-Kontroll
2 x Rapid Ligation Puffer	5 µl	5 µl
psiSTRIKE-hMGFP (50 ng/µl)	1 µl	1 µl
Annealed Oligos (1:10 verdünnt)	1 µl	-
H <sub>2</sub> O (Nuclease-frei)	2 µl	3 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl	1 µl

Anschließend wurde in die shRNA-Vektoren das Neomycin-Resistenzgen (PGK\_Neo<sup>R</sup>-Kassette) kloniert. Fünf µg der shRNA-Plasmide und 5,5 µg des die PGK\_Neo<sup>R</sup>-Kassette enthaltenden Plasmids TOPO-NFL wurden mit dem Restriktionsenzym *KpnI* (20 U) bei 37° C für 2 h inkubiert. Um das Restriktionsenzym zu denaturieren wurde der Inkubationsansatz bei 80° C für 20 min inkubiert. Anschließend ließ sich das die PGK\_Neo<sup>R</sup>-Kassette enthaltende Fragment auf einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch vom Vektor trennen ((Abb.7), Kap. 4.2.1.1), ausschneiden und aufreinigen (Kap. 4.2.1.3). PGK\_Neo<sup>R</sup>-Kassette und geschnittene shRNA-Vektoren wurden miteinander ligiert (Tab. 8). Anschließend wurde die gewonnenen Plasmide in elektrokompente *E.coli* HB101 transformiert.

Tab.8: Ligations-Ansatz in der SOAT-RNAi Neomycin Kasette.

<b>Ligations-Ansatz</b>	<b>Volumen</b>
2 x Rapid Ligation Puffer	2 µl
shRNA-Vektor [ <i>KpnI</i> ]	1 µl
PGK_Neo <sup>R</sup> -Kasette [ <i>KpnI</i> ]	3 µl
H <sub>2</sub> O (Nuclease-frei)	14 µl
DNA-Ligase	1 µl

#### 4.2.1.8 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA durch Elektroporation

Bei der Elektroporation wird die Zellmembran durch einen kurzen elektrischen Impuls so verändert, dass die Zellen DNA aus der Umgebung aufnehmen können. Vor der Elektroporation müssen die Zellen allerdings kompetent für die DNA-Aufnahme gemacht werden. Durch die Transformation nehmen kompetente Bakterien zirkuläre oder linearisierte Plasmide auf. Die elektrokompenten *E. coli* Hb101 wurden auf Eis aufgetaut, 1 µl Ligationsansatz hinzugefügt und die Mischung in eine vorgekühlte (4° C) 2 mm Küvette gegeben. Die Küvette wurde 1 min auf Eis inkubiert, danach wurde die Elektroporation bei 2,5 kV und 25 µF durchgeführt.

Anschließend wurden 1000 µl NZY-Medium (37° C) zugegeben, der Ansatz in ein 2 ml Eppendorfröhrchen überführt und bei 37° C und 225 rpm für 1 h im Schüttelinkubator bebrütet. Danach wurden die Ansätze auf je eine LB-Amp-Platte ausplattiert. Zusätzlich wurden je LB-Amp-Platte und eine hemmstofffreie Platte mittels einer Impföse mit nicht-transformierten *E. coli* beimpft, um die Zellen auf Vermehrungsfähigkeit und Resistenzeigenschaft zu überprüfen. Die Platten wurden bei 37° C über Nacht bebrütet.

##### Luria-Bertani (LB)-Platten:

NZ-Amin-Casein-Hydrolysat	10 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
Agar-Agar	20 g/l

mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, 20 min bei 121° C autoklaviert, auf 60° C abgekühlt und unter sterilen Bedingungen auf 40 Petrischalen verteilt.

LB-Ampicillin-Platten:

NZ-Amin-Casein-Hydrolysat	10 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
Agar-Agar	20 g/l

mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, 20 min bei 121 ° C autoklaviert, nach Abkühlen auf 60 ° C  
Zugabe von 100 mg Ampicillin/l, unter sterilen Bedingungen auf 40 Petrischalen verteilt.

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) mit Ampicillin:

NZ-Amin-Casein-Hydrolysat	10 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	10g/l

auf pH 7 mit NaOH eingestellt, 20 min bei 121 ° C autoklaviert, nach Abkühlen auf 60 ° C mit  
100 mg Ampicillin/l versetzt und verteilt.

Hepes Puffer:

HEPES	23,83 g
ddH <sub>2</sub> O	100 ml

pH 7,4 (mit NaOH eingestellt)

**Bakterienmedien**

Alle verwendeten Bakterienkulturen wurden in Luria-Bertani (LB)-Medium kultiviert.

NZY+-Brühe (hemmstofffreies Medium):

NZ-Amin-Casein-Hydrolysat	8 g/l
Hefe-Extrakt	4 g/l
NaCl	4 g/l

mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, 20 min bei 121 ° C autoklaviert; kurz vor der Verwendung  
wurden 10 ml der Lösung mit 125 µl 1 M MgCl<sub>2</sub>, 125 µl 1 M MgSO<sub>4</sub> und 100 µl 2 M Glucose  
(sterilfiltriert) versetzt.

**4.2.1.9 Isolieren der Kolonien und Animpfen von Kulturen**

Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Platten kontrolliert. Jede Kolonie auf den LB-Amp-Platten ging aus einer transformierten Bakterienzelle hervor.

Um diese einzelnen Klone getrennt untersuchen zu können wurden die Einzelkolonien von der Platte gepickt und in Selektionsmedium mit Ampicillin vermehrt. Die untransformierten

Zellen sollten nur auf den hemmstofffreien Platten wachsen und auf den LB-Amp-Platten keine Kolonien bilden. Wenn die Kolonien der transformierten Zellen auf den LB-Amp-Platten einen Durchmesser von etwa 0,5-1,0 mm erreicht hatten, wurden jeweils sechs der Einzelkolonien unter sterilen Bedingungen mit einer sterilen, abgeflamten Impföse von der Agarplatte in ein beschriftetes Kulturröhrchen mit 3 ml LB-Medium und 3 µl Ampicillin-Stammlösung in ddH<sub>2</sub>O 100 µg/ml (1:1000) überführt und bei 37° C und 225 rpm im Schüttelinkubator bebrütet.

Die Vermehrung der Bakterien im Kulturröhrchen lässt sich mit dem Auge durch eine zunehmende Trübung verfolgen und anhand der optischen Dichte bei 600 nm quantifizieren. Wird der Kulturflüssigkeit ein Antibiotikum zugesetzt, können sich die Bakterien der Kolonie nur dann vermehren, wenn sie die entsprechende Antibiotikaresistenz tragen. Diese selektive Anzucht kann genutzt werden, um nach einer Klonierung nur das Wachstum der gewünschten rekombinanten Bakterien zu ermöglichen.

#### **4.2.1.10 Einfrieren von transformierten Bakterien**

Um für eine spätere Plasmid-Präparation wieder auf einen bestimmten Bakterienklon zurückgreifen zu können, wurden Glycerin-Kulturen angelegt. 850 µl einer über Nacht in LB-Medium gewachsenen Bakterien-Suspension wurde mit 150 µl Glycerin in ein verschraubbares Einfrier-Röhrchen gegeben und nach sorgfältigem Mischen dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren, anschließen bei -70° C gelagert.

#### **4.2.1.11 Plasmid-Präparationen im Mini- und Midi-Maßstab**

Für die Präparation von Plasmiden im Mini-Maßstab wurde das *QIAprep Miniprep Kit* (Qiagen) benutzt. Die Präparation in großen Mengen (Midi) erfolgte mit Hilfe des *Qiagen Plasmid Midi Kits*. Hierfür wurde in 3 ml (Mini-Maßstab) bzw. 50 ml (Midi-Maßstab) Medium eine Übernachtskultur der Klon hergestellt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte, analog zur Mikro-Präparation, durch die alkalische Lyse. Die Reinigung der Plasmid-DNA wurde über eine QIAGEN-tip 100 Säule erreicht.

Lösungen:Puffer P1:

Tris	50 mM
EDTA	10 mM
auf pH 8,0 mit HCl eingestellt	
RNase A	100 µg/ml

Puffer P2:

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Puffer P3:

K-Acetat	3 M
auf pH 5,5 mit konzentrierter Essigsäure eingestellt.	

Puffer QBT:

NaCl	750 mM
MOPS	50 mM
Ethanol	15 %
Triton X-100	1,5 %
pH 7,0	

Puffer QC:

NaCl	1 M
MOPS	50 mM
Ethanol	15 %
pH 7,0	

Puffer QF:

NaCl	1,5 M
Tris	50 mM
Ethanol	15 %
pH 8,5	

(Puffer P1 bis QF wurden als fertige Lösungen aus dem QIAGEN® Plasmid Midi Kit verwendet.)

LB-Amp-Medium (siehe oben)



### **Herstellung einer 50 ml Übernachtskultur**

Aus 6 Klonen einer Mutation mit korrektem Plasmidschnittmuster wurde willkürlich eine ausgewählt. Die Probe wurde auf Eis aufgetaut, unter sterilen Bedingungen in 50 ml LB Amp-Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und 16 h bei 37° C und 225 rpm im Schüttelinkubator bebrütet. Danach wurden kleine Aliquots der Kulturen eingefroren und das übrige Material zur Plasmid Midi-Präparation weiterverwendet.

### **Plasmid Midi-Präparation mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit**

Die Kulturen wurden in 50 ml Sarstedt-Röhrchen bei 6.000 x g bei 4° C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Röhrchen wurde auf den Kopf gestellt, bis möglichst viel Medium abgelaufen war. Das Pellet wurde in 4 ml Puffer P1 durch Vortexen resuspendiert, mit 4 ml Puffer P2 versetzt, und vorsichtig invertiert, um eine Scherung der chromosomalen DNA zu verhindern und 5 min bei RT inkubiert. Die Lösung war nun sehr viskös. Im Anschluss wurden 4 ml eisgekühlter Puffer P3 zugegeben, vier- bis sechsmal invertiert und 15 min auf Eis inkubiert. Durch die niedrige Temperatur wurde die Präzipitation gefördert. Es entstand ein weißer Niederschlag aus chromosomaler DNA, Proteinen, Zelldedritus und SDS. Die Röhrchen wurden nun bei 20.000 x g bei 4° C 30 min zentrifugiert. Während dieser Zeit wurden die QIAGEN-tip100 Säulen auf 50 ml Sarstedt-Röhrchen aufgesetzt und mit 5 ml Puffer QBT zum Equilibrieren befüllt. Nachdem der Puffer aus den Säulen abgetropft war, wurden Faltenfilter von 185 mm Durchmesser auf die Säulen aufgesetzt und mit 2 ml ddH<sub>2</sub>O befeuchtet. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde durch den Filter auf die Säulen gegeben. Nachdem die Lösung durchgelaufen war, wurden die Säulen zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen. Die Säulen wurden dann auf neue 50 ml Sarstedt-Röhrchen aufgesteckt und die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wurde mit 3,5 ml Isopropanol bei RT präzipitiert und bei 15.000 x g bei 4° C 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, um das Pellet nicht zu verlieren, das Pellet mit 2 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut bei 15.000 x g bei 4° C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgegossen, das Pellet bei 80° C im Trockenschrank getrocknet und in 100 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

#### **4.2.1.12 Ethanol-Fällung von DNA**

Um DNA aus wässrigen Lösungen aufzureinigen, insbesondere um Phenolreste aus der Lösung zu entfernen, kann sie durch Zugabe eines Salzes und nachfolgende Zugabe von Alkohol (Ethanol oder Isopropanol) ausgefällt werden. Die Präzipitation der DNA erfolgte nach Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Na- Acetat und 3 Vol. 100 % Ethanol und folgender Inkubation auf Eis für 10 min. Nach Zentrifugation des Fällungsansatzes (15 min, 13000 x g, 4° C) und

Entfernung des Überstands wurde das Pellet mit 4 Vol. 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 13000 x g, 4° C). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Je nach DNA-Menge wurde die präzipitierte DNA in einem geeigneten Volumen (meistens 70 µl) ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 4.2.1.13 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA- und RNA-Konzentration wurde in einem UV-Photometer (Beckmann) bestimmt, in dem bei einer Wellenlänge von 260 nm die optische Dichte (OD<sub>260</sub>) der Nukleinsäurelösung in einer Quarzküvette gemessen wird. Nach folgender Formel lässt sich die Konzentration der DNA und RNA berechnen.

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \frac{\text{Absorption}[260 \text{ nm}] \times E [\mu\text{g}] \times \text{gemessenes Volumen}}{\text{Eingesetztes Volumen (50 x 1000 } \mu\text{l)}}$$

gemessenes Volumen: Verdünnungsfaktor

E (Extinktionskoeffizient in Wasser): 40 µg für RNA und 50 µg für DNA

Die Division der Extinktionen bei 260 und 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit von DNA-Lösungen und sollte zwischen 1,8 und 2,0 und für RNA über 1,8 liegen. Niedrige Werte zeigen eine Kontamination mit Proteinen an.

#### 4.2.1.14 Analytischer Verdau gewonnener Plasmid-DNA zur Kontrolle der Schnittmuster

Um zu kontrollieren, ob es sich bei der gewonnen DNA um die gewünschte Plasmid-DNA handelte, wurde die DNA einem Restriktionsverdau unterzogen. Bei den verwendeten Restriktionsendonukleasen handelte es sich um das Enzym *Sma*I für SOATF3, *Sal*I und *Bgl*II für SOATiKontroll1 und *Sal*I und *Bgl*II für SOATi2Neo. Pro Plasmid-DNA wurde 1 µl der in der Mini-Präparation gewonnenen Lösung eingesetzt. Die Ansätze zeigen Tabellen 9, 10 und 11. Die Proben und die Kontrolle wurden 2 h bei 37° C inkubiert.

Tab. 9: Ansatz zum analytischen Verdau für SOATF3

<b>Ansatz</b>	<b>Volumen</b>
1 µg DNA	1 µl
<i>Sma</i> I	1 µl
Restriktionspuffer	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	16 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tab. 10: Ansatz zum analytischen Verdau für SOATiKontroll1

<b>Ansatz</b>	<b>Volumen</b>
1 µg DNA	1 µl
<i>Sal</i> I	1 µl
<i>Bgl</i> II	1 µl
Puffer R <sup>+</sup>	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	15 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tab. 11: Ansatz zum analytischen Verdau für SOATi2Neo

<b>Ansatz</b>	<b>Volumen</b>
1 µg DNA	1 µl
<i>Sal</i> I	1 µl
<i>Bgl</i> II	1 µl
Puffer R <sup>+</sup>	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	15 µl
Gesamtvolumen	20 µl

#### 4.2.1.15 Analyse des Restriktionsverdaus mittels Elektrophorese

Die Kontrolle erfolgte über eine horizontale Elektrophorese auf einem 1 %igen Agarosegel in TAE-Puffer. Von den Ansätzen der Proben und der Kontrolle wurden 20 µl mit 3 µl Ladepuffer versetzt und in die Slots geladen. Als DNA-Längenstandard wurde der GeneRuler™ DNA Ladder Mix eingesetzt. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel wie oben beschrieben gefärbt und fotografiert. (SOATF3 [*Sma*I] (Abb. 6), SOATi2Neo [*Sa*II, *Bg*II] (Abb. 8), SOATiKontroll1 [*Sa*II, *Bg*II] (Abb.9)).

#### 4.2.1.16 Linearisierung des Plasmids

Zur Transfektion der Zellen mit Plasmide, wurden diese zuvor linearisiert. Diese Linearisierung erfolgte durch ein Restriktionsenzym, dass das Plasmid nur einmal und an einer Position außerhalb der für die Transfektion notwendigen Elemente schneidet. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Durch anschließende Phenolextraktion wurde das Restriktionsenzym entfernt.

#### 4.2.1.17 Phenolextraktion

Proteine können aus Nukleinsäurelösungen durch Extraktion mit Phenol entfernt werden. Die zu extrahierende Lösung wurde mit TE-Puffer auf 200 µl aufgefüllt und mit 200 µl einer Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 versetzt, gevortexet und 5 min 14500 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige DNA-Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dieser Prozess wurde so oft wiederholt, bis die Interphase zwischen der wässrigen und der Phenolphase frei von Trübungen blieb (1-2 mal). Danach folgte eine Fällung der DNA mit Natriumacetat und Ethanol. Da bei der Phenolextraktion DNA verloren geht, wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

## 4.2.2 Zellbiologische Methoden

### 4.2.2.1 Kultivierung von Zellen

Bei den beiden Zelllinien MCF7 und T47D handelt es sich um adhärenz Zellen, die in T-REX-Medium, bestehend aus Dubeco's modified Eagle media (DMEM) mit Zusätzen (Tab. 12) bei 37 °C, 10 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit (Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre) in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator im allgemeinen bis zur Konfluenz kultiviert wurden. Dabei wurde das Wachstumsmedium alle 3 Tage gewechselt. Nach Konfluenz des Zellrasens wurden die Zellen auf neue Kulturgefäße übertragen.

Tab. 12: Standard-Zellkulturmedium T-REX

Standard-Zellkulturmedium T-REX	Prozent
D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	43,5 %
F-12 Nutrient Mixture (HAM) + Glutamin	43,5 %
FKS (Fetales Kälberserum)	10 %
L-Glutamin (200 mM)	2 %
Penicillin/Streptomycin*	1 %

\* Penicillin; 10.000 U/ml, Streptomycin; 10mg/ml

### 4.2.2.2 Passagierung von Zellen

#### Lösungen:

#### 1 x Trypsin:

10 x Trypsin/EDTA (Trypsin 5 mg/ml, EDTA 2,2 mg/ml) wird 1:10 in PBS oder HEPES Puffer verdünnt.

#### PBS:

NaCl	137 mM	8 g/l
KCl	2,7 mM	0,2 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM	1,3 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM	0,2 g/l
pH 7,4		

Zum Passagieren unter sterilen Bedingungen wurden das alte Medium von den konfluenten Zellen abgesaugt und diese einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden zum Lösen des

Zellrasens für wenige Minuten bei 37° C in 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Das Trypsin wurde mit 2 ml des T-REX-Mediums (Tab. 12) inaktiviert, da das enthaltene Fetale Kälberserum (FKS)  $\alpha$ 1-Antitrypsin enthält. Die Zellen wurden anschließend bei 390 x g für 2 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden sie in 1 ml des Kulturmediums (T-REX) wieder aufgenommen und auf die fünf- bis zehnfache Kulturfläche ausplattiert.

#### **4.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Ermittlung der Zellzahl, wurden die Zelllinien wie beim Passagieren von den Kulturschalen mit 1 x Trypsin-EDTA-Lösung gelöst und das Trypsin mit T-REX-Medium inaktiviert. Die Zellen wurden für 2 min bei 200 x g sedimentiert und in 1 ml T-REX-Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50  $\mu$ l der Zellsuspension 50  $\mu$ l Trypanblau-Lösung (0,4 %) und 400  $\mu$ l PBS gemischt (1:10). Die Zellzahl wurde in eine Bürker-Türk-Zählkammer bestimmt.

#### **4.2.2.4 Einfrieren der Zellen**

Zur Langzeitlagerung der Zellen wurden, wie beim Passagieren, von jeder Zelllinie in der logarithmischen Wachstumsphase Glycerin-Kulturen angelegt. Dazu wurden, wie oben beschrieben, die Zellen einer 10 cm-Schale vor ihrer Konfluenz mit 0,25 %igen Trypsin-EDTA-Lösung in Suspension gebracht und durch Zentrifugation sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in 0,9 ml T-REX-Medium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen, in dem 0,1 ml DMSO vorgelegt waren, gegeben, durch Überkopfschütteln gemischt und stufenweise zunächst über Nacht bei –80° C und letztendlich zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### **4.2.2.5 Auftauen von Zellen**

Das Auftauen muss möglichst schnell erfolgen. Hierzu wurden die Zellen im Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37° C aufgetaut und zusammen mit dem Einfriermedium sofort in eine Zellkulturflasche (250 ml, 75 cm<sup>2</sup> Sarstedt) mit 10 ml Wachstumsmedium überführt. Das Medium wurde nach Adhäsion der Zellen (12-24 h) gewechselt.

### 4.2.3 Transfektion der Zelllinien MCF7 und T47D mit den konstruierten Plasmiden

Zur Transfektion von eukaryontischen Zellen standen verschiedene Methoden zur Verfügung. Zum einen die Transfektion über chemische Reagenzien, d.h. kationische Lipide oder Calcium-Phosphat, zum anderen durch Elektroporation. Um eine möglichst effiziente Transfektion der Zellen zu erreichen, wurden verschiedene Transfektionsreagenzien und Elektroporationsbedingungen im 24-Well-Format getestet. Folgende Transfektionsreagenzien wurden eingesetzt:

Lipofectamine® (Invitrogen)

Lipofetamine2000® (Invitrogen)

Metafectene® (Biontex)

Fugene6® (Roche)

Dafür wurden T47D-Zellen im 24-Well-Format mit Zellen 20.000 platiert. Penicillin/Streptomycin-freiem Medium wurde nur bei der Verwendung von Lipofetamine2000® zugesetzt. Den Zellen wurde Lipofectamine®, Lipofetamine2000®, Metafectene® und Fugene6® (2.5, 2.0, 1.75 und 1.0 µl) mit Plasmid-DNA SOATi2Neo4 (0.3, 0.8, 0.5 und 0.5µg) zugesetzt.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen im entsprechenden Medium ohne Antibiotika ausgesät, so dass ihre Dichte zum Transfektionszeitpunkt ca. 50 % betrug. Die benötigte Menge an siRNA wurde in der entsprechenden Menge Optimum verdünnt. Nach einer Inkubation bei RT für 5 min wurden die beiden Lösungen zusammengegeben und vorsichtig gemischt. Eine weitere Inkubation für 30 min bei RT erlaubte die Bildung der T47D-RNA-Komplexe, die dann tropfenweise auf die Kulturschalen gegeben wurden. Es erfolgte kein Wechsel des Mediums.

Damit die Zellen transfizierte DNA stabil aufnehmen, müssen sie unter einen Selektionsdruck gesetzt werden, damit die DNA in das Genom integriert wird. Da die stabil zu integrierenden Plasmide kein eigenes eukaryotisches Antibiotika- Resistenzgen trugen, wurde ein Plasmid mit einem Geneticin (250-4000 µg G418/ml Medium) -Resistenzgen co-transfiziert. Nach ein bis zwei Tagen begannen die nicht resistenten Zellen abzusterben. Die nun wachsenden Kolonien wurden mit einer Pipette gepickt und in 24-Well Platten überführt.

Parallel wurde die Effizienz der Transfektion über Elektroporation getestet. Da die Zellen bei diesem Verfahren stark geschädigt bzw. abgetötet werden können, mussten in Versuchsreihen die optimalen Bedingungen ermittelt werden. Die Transfektionseffizienz der Methoden konnte leicht durch den eingesetzten shRNA-Vektor überprüft werden, da in dem Plasmid auch eine Expressionskassette für das Green-Fluorescent-Protein (GFP) enthalten ist. Dieses Protein, abgeleitet aus dem ursprünglich aus der Koralie *Montastrea cavernosa*

klonierten Protein, zeigt bei Anregung mit 480 nm Wellenlänge eine Fluoreszenz von 515 nm. Nach Anfärbung der DNA des Zellkerns mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), das bei 358 nm Anregung mit 400 nm fluoresziert, kann die Zellzahl in einem Bildausschnitt bestimmt und der Zahl der GFP-positiven Zellen gegenüber gestellt werden. Abb. 10 zeigt beispielhaft T47D-Zellen nach Transfektion mit dem shRNA-Vektor mittels Lipofectamine2000® und DAPI-Färbung.

Der Einsatz eines BioRad XCell® Elektroporators ermöglichte es, die Zellen nach einem sogenannten Square-Wave-Protokoll zu transfizieren. Bei der Elektroporation werden die Zellen in dem Elektroporationsgerät in ein elektrisches Feld gebracht und kurzen elektrischen Impulsen mit hoher Feldstärke ausgesetzt. Dabei entstehen kurzzeitig Poren in der Zellmembran, durch die DNA in die Zelle gelangen kann.

20 µg der linearisierten Plasmid-DNA und  $10^6$  Zellen wurden pro Elektroporation eingesetzt. Um einen elektrischen Durchschlag zu vermeiden, sollte sich die DNA in einer Lösung mit sehr geringer Ionenstärke (im Idealfall bidest. Wasser) befinden. Für jeden Zelltyp müssen die Parameter optimiert werden. Um dies zu erreichen, wurden zweidimensional - Expositionszeit (10, 20 ms) und Spannung (90, 100, 110, 120, 130 V) variiert und verschiedene Puffer (PBS, OPTIMEM, Hepes Puffer) eingesetzt. Zur Elektroporation der humanen Brustkrebs-Adenokarzinomlinien MCF7 und T47D erwies sich eine Spannung von 120 V als optimal. Für MCF7-Zellen wurde als optimale Zeit ein Wert von 20 ms, für T47D von 10 ms ermittelt. Unter den Medien erwies sich OPTIMEM als am besten geeignet. Aus den gewonnenen Parametern wurde folgendes Protokoll entwickelt:

$10^6$  Zellen wurden in 200 µl Optimem aufgenommen, in zur Elektroporation geeignete 4 mm Küvetten überführt. 20 µg DNA, gelöst in möglichst wenig ddH<sub>2</sub>O wurde hinzugegeben. Nach Mischen und Inkubation über 5 min wurden die Zellen elektroporiert (120 V, für MCF7 bei 20 ms, für T47D 10 ms, Bio-Rad Gene Pulser) und unmittelbar danach mit 1 ml T-REX-Medium versetzt.

Schließlich wurden die Zellen wieder in einer 10 cm Petrischale mit 10 ml T-REX Medium ausgesät. Damit in diesen Zellen die vorhandene Neomycin-Antibiotikaresistenz der Plasmide ausgenutzt werden kann, wurde 24 h nach Transfektion das Medium durch das Antibiotika-haltige Selektionsmedium ersetzt.

#### 4.2.4 Stabile Transfektion

Stabile Transfektion bedeutet, dass in eine Zelle eingebrachte DNA fest in das Genom integriert wird. Dies kann durch die Ausnutzung eines Antibiotikaresistenzgens im Vektor erreicht werden. Nicht stabil transfizierte Zellen sind im antibiotikahaltigem Medium nicht überlebensfähig. Stabil transfizierte Zellen können proliferieren und bilden Kolonien. Eine



Kolonie entspricht dann einem Zellklon. Das Neomycin-Antibiotikaresistenzgen ist sowohl im pcDNA3.1(+) Vektoren als auch SOATi2Neo4 vorhanden. Es handelt sich dabei um eine Phosphotransferase, welche die Aminoglykosid-Antibiotika Neomycin und Geneticin (G418) durch Phosphorylierung inaktiviert. Zur Selektion der Zellen, welche die Vektoren stabil in ihr Genom integriert hatten, wurden die Zellen in einem Medium kultiviert, das G418 enthielt. Die notwendige Konzentration zum Abtöten der nicht stabil transfizierten Zellen wurde in einer Konzentrationsreihe ermittelt (250-4000 µg G418/ml Medium). Für beide Zelllinien stellte sich heraus, dass eine G418-Konzentration von 750 µg/ml notwendig ist, sie wurden 7-12 Tage lang behandelt.

Nachdem das oben beschriebene Protokoll erarbeitet war, wurden die Zelllinien mit den Vektoren durch Elektroporation wie oben beschrieben transfiziert, auf 10 cm Kulturschalen plattiert und selektioniert.

Nach ein bis zwei Tagen begannen die nicht resistenten Zellen abzusterben. Die nun wachsenden Kolonien wurden mit einer Pipette gepickt und in 24-Well-Platten überführt. Nach etwa 7 Tagen waren in den Kulturschalen Kolonien zu erkennen, die auf 24-Well-Platten vereinzelt wurden und als Einzellklone bezeichnet. Zusätzlich wurde von jedem Vektor eine Sammelkultur gewonnen und vereinzelt. Die Zellen wurden so lange kultiviert und in größere Kulturgefäße übertragen, bis etwa  $20 \times 10^6$  Zellen vorhanden waren. Die Bezeichnung der jeweiligen Zelllinien zeigt Tabelle 13. Anschließend wurden die Zelllinien kryokonserviert (Kap. 4.2.2.4).

Tab. 13: Bezeichnung der gewonnenen Zelllinien nach der stabilen Transfektion.

<b>Plasmid</b>	<b>MCF7</b>	<b>T47D</b>
SOATiKontrolle1Neo4	MCF7sk Sammelklon	T47Dsk Sammelklon
SOATi2Neo4	MCF7si Sammelklon1	T47Dsi Sammelklon1
	MCF7si Sammelklon2	T47Dsi Sammelklon2
	MCF7si Sammelklon3	T47Dsi Sammelklon3
	MCF7si Sammelklon4	T47Dsi Sammelklon4
		T47Dsi Sammelklon5
		T47Dsi Sammelklon6
		T47Dsi Sammelklon7
pcDNA3.1(+)	MCF7pc3 Sammelklon	T47Dpc3 Sammelklon
SOATF3	MCF7sf3 Sammelklon	T47Dsf3 Sammelklon
	MCF7sf3 Einzelklon1	T47Dsf3 Einzelklon
	MCF7sf3 Einzelklon2	
	MCF7sf3 Einzelklon3	
	MCF7sf3 Einzelklon4	

#### 4.2.5 Nachweis der Integration der Vektoren in das Genom

Zur Überprüfung der stabilen Integration wurde eine PCR (polymerase chain reaction) durchgeführt, die die hSOATF-Expressionskassette bzw. die shRNA-Kassette nachweist.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von spezifischen DNA-Sequenzen. Als Reaktionsprinzip liegt die Replikation der DNA in der Zelle zugrunde. DNA-Polymerasen synthetisieren aus einzelsträngiger DNA einen komplementären DNA-Strang. Der DNA-Polymerase dienen Primer, die aus kurzen Nukleotidsequenzen bestehen, als Startpunkt. Diese Primer müssen eine Sequenz aufweisen, die mit dem Matrizenstrang hybridisieren kann. Die Reaktion besteht aus drei Teilschritten bei unterschiedlichen Temperaturen. Zuerst erfolgt die Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei 94° C, bei der die DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen wird. Dann folgt das Annealing bei ca. 50° C zur Hybridisierung der Primer mit den DNA-Matrizen. Nach der Hybridisierung wird die Polymerasereaktion bei ca. 70° C zur DNA-Kopierung durchgeführt. Durch vielfaches Wiederholung dieser Zyklen lassen sich definierte DNA-Abschnitte amplifizieren.

#### 4.2.6 Präparation genomischer DNA und die Polymerasekettenreaktion (PCR)

##### 1x TE-Puffer:

Tris-HCl	10mM (pH 7.4)
EDTA	1mM (pH 8)

##### Ansatz für Lysispuffer:

Stoff	Molarität	Menge
Tris	100 mM, pH 8,5	6,057 g
Na-EDTA	5 mM	0,93 g
SDS	0,2 mM	10 ml aus 10%igem
NaCl	200 mM	5,844 g

Puffer: Lysispuffer bestehend 1 µl Proteinase K (aus 20g/l Stammlösung)

Hierfür wurden die transfizierten und die nativen Zelllinien (als Negativ-Kontrolle) durch einen Detergens und Proteinase K enthaltenden Lysis-Puffer aufgeschlossen, um die genomische DNA zu gewinnen. Dazu wurden die transfizierten und die nativen Zelllinien in 24 Well-Platten mit einer Zellzahl von 200.000 Zellen/Well platiert und kultiviert. Nach Konfluenz des Zellrasens wurden die Zellen mit PBS von dem Kulturmedium gereinigt und 500 µl/Well Lysispuffer zugesetzt und im CO<sub>2</sub>-Inkubator über Nacht verdaut. Am nächsten Tag wurde 500 µl/well 2-Propanol für 1 h zugegeben, die in Fäden ausgefallene DNA mit einer Kanüle herausgefischt und in ein Eppendorfgefäß übertragen. Die DNA wurde mit 200 µl Ethanol versetzt, um das Isopropanol zu entfernen, abzentrifugiert und das Ethanol entfernt. Das Pellet wurde getrocknet und in 100 µl 1 x TE-Puffer für 30 min bei RT gelöst. Von der genomischen DNA wurden 250 ng in PCR eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurden 0,5 ng Plasmid DNA der Vektoren verwendet.

Die in der PCR eingesetzten Oligonukleotide sind in Tabelle 14 aufgeführt und die Zusammensetzung der Reaktionslösung wurde in Tabelle 15 gezeigt. Die PCRs wurden, wie in Tabelle 16 beschrieben, in einem MJ Mini® Gradient Thermal Cycler (BIO-RAD) durchgeführt. Zum Nachweis der erhaltenen Amplifikate werden die PCR-Produkte im Agarosegel aufgetrennt.

Es wurden Amplifikate für den Nachweis der shRNA-Vektoren in den transfizierten MCF7 und T47D-Zelllinien von 450 Bp, für den Nachweis der SOATF3 und pcDNA3.1(+) in den transfizierten MCF7 und T47D-Zelllinien von 2,2 kb sowie von 1 kb für pcDNA3.1(+)<sub>1</sub> erwartet.

Tab.14: Oligonukleotide zum Nachweis der vektoriellen DNA-Sequenzen im Genom der stabil transfizierten Zelllinien und die Größe der entstehenden Fragmente

Primer	Sequenz	Fragmentgröße
<b>hSOAT-Kassette f</b>	5'-TTTGCCTGCTTCGCGATGTACGG-3'	pcDNA3.1(+): 1 kb
<b>hSOAT-Kassette r</b>	5'-ATAGAGCCCACCGCATCCCCAGC-3'	SOATF3: 2,2 kb
<b>shRNA-Kassette f</b>	5'-GACGTTGTAAAACGACGGCC-3'	shRNA: 450 Bp
<b>shRNA-Kassette r</b>	5'-ATGACCATGATTACGCCAAGC-3'	

Tab. 15: Pipettierschema für PCR

Komponente	Menge
Template DNA	1 µl (250 ng)
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
MgCl <sub>2</sub>	2 µl
Primer forward (10 µM)	1 µl
Primer reverse (10 µM)	1 µl
10 x PCR-Puffer	2 µl
H <sub>2</sub> O bidest. steril (DEPC)	11,5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tab. 16: PCR-Protokolle für den Nachweis der stabilen Integration der Vektoren in das Genom der Zelllinien.

PCR	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Hybridisierung	Polymerisierung	Finale Polymerisierung
Expressionsvektor und Kontrolle SOATF3/pcDNA3.1(+)	94° C, 2'30''	94° C, 20''	63° C, 30''	72° C, 2'00''	72° C, 5'00''
shRNA-Vektor und Kontrolle SOATi2Neo4/SOATiKontrolleNeo4	94° C, 2'30''	94° C, 20''	57° C, 30''	72° C, 0'30''	72° C, 5'00''
35 Zyklen					

#### 4.2.7 Nachweis des Expression von SOAT

Um die Transkription der SOAT-cDNA nachzuweisen, wurde mit SOAT-spezifischen Oligonukleotiden eine Reverse Transkriptase-PCR und Quantitative RT-PCR durchgeführt.

Die RT-PCR ist eine sensitive Methode, um RNA nachzuweisen. Da die Polymerase DNA als Substrat nutzt, muss vor der Amplifikation eine reverse Transkription erfolgen. Dabei wird durch das Enzym Reverse Transkriptase aus RNA die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert.

Die quantitative real-time PCR stellt eine moderne Technologie dar, die im molekularbiologischen Bereich mittlerweile sehr breite Verwendung findet. Im Vergleich zu bisherigen PCR-Methoden, bei denen DNA-Produkte nur qualitativ nachgewiesen werden konnten, wurde es durch Entwicklung der quantitativen real-time PCR möglich, Aussagen über die Ausgangs-DNA- bzw. RNA-Mengen zu machen.

#### 4.2.8 RNA Präparation aus Zellen

##### Lösungen und Medien:

DEPC-Wasser 0,1 %	1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC, 1 mg/ml) 1 l ddH <sub>2</sub> O
	Übernacht bei RT inkubieren (RNAasen werden abgebaut) und autoklavieren (DEPC wird abgebaut)

Um die RNA zu gewinnen, wurde die Gesamt-RNA zunächst mit dem peqGOLD RNAPure™-Reagenz (PEQLAB Biotechnologie GmbH) aus wildtyp- und SOAT-transfizierten MCF7 und T47D Zelllinien isoliert. Die Zellen wurden drei Tage vor der RNA-Präparation zu 10<sup>6</sup> Zellen pro in 10 cm-Petris-Schale platiert. Am Tage der Präparation wurden sie mit 1 ml peqGOLD RNAPure™ lysiert. Nach dem Lösen der Zellen mit einem Schaber wurde die Zellsuspension durch 10- 15maliges Auf- und Abziehen durch eine 1000 µl Pipette homogenisiert.

Die Lysate wurden dann für 5 min bei 25° C inkubiert. Danach wurden 0,2 ml Chloroform je eingesetztem ml peqGOLD zugegeben und für 15 s kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Lysate für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Lysate für 5 min bei 12.000 x g und bei 4° C zentrifugiert. Die Zugabe von Chloroform und der Zentrifugationsschritt führen zu einer Phasentrennung, wobei die RNA in der oberen wässrigen Phase enthalten ist. Die DNA und Proteine verbleiben dagegen in der unteren organischen Phase bzw. in der Interphase. Die obere Phase wurde abgezogen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500 µl Isopropanol pro eingesetztem ml peqGOLD zugegeben. Die Proben wurden für 15 min bei 4° C inkubiert. Anschließend wurden sie für 10 min bei 12.000 x g und 4° C zentrifugiert. Das Präzipitat sollte von gelartiger

Konsistenz sein und an der unteren Seite des Röhrchens liegen. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen und das Pellet zweimal mit 1 ml 70 %igem Ethanol durch Zentrifugation für 10 min gefällt und gewaschen. Die Pellets wurden bei RT getrocknet. Zum Schluss wurden die Pellets in 40 µl RNase-freiem Wasser gelöst und auf Eis für 30 min resuspendiert. Einzelne Aliquots wurden pro Gewebe zusammengefasst und die Konzentration der RNA wurde im Beckmann Photometer bei 260 nm bestimmt. Zwei µl der zu messenden Proben wurden in 198 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Als Leerwert dienten 198 µl ddH<sub>2</sub>O plus 2 µl RNase-freies Wasser. Die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $OD_{260}$ ) sollte zwischen 0,1 und 1,0 liegen und der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  sollte größer als 1,8 sein.

Die gewonnene RNA wurde mit Ethanol ausgefällt. Die Präparation wurde zur Vermeidung der Kontamination mit RNasen mit sterilen, DNase- und RNase-freien Filterspitzen sowie DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O (RNase-frei) durchgeführt. Die RNA-Proben wurden bei –80° C gelagert.

#### 4.2.9 cDNA Synthese Reverse Transkription; von RNA zu cDNA Synthese

Da RNA nicht direkt mittels PCR amplifiziert werden kann, muss sie zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dies geschieht mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase - der Reversen Transkriptase (RT). Als Primer wurde ein Oligo(dT)- Primer eingesetzt, der an den poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA bindet. Das Enzym bindet an die freie 3'-OH-Gruppe des Primers und synthetisiert einen zur RNA-Matrize komplementären cDNA-Strang. Die Synthese einzelsträngiger cDNA erfolgte mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit Fermentas nach Herstellerangaben. In 6 µl DEPC-behandeltem Wasser wurde 1 µl Oligo(dT)-Primer und 4 µg RNA eingesetzt. Die isolierte RNA wurde auf Eis aufgetaut und 5 min bei 70° C denaturiert. Nachdem eine geeignete Menge des Standard-Reaktionsansatzes zugesetzt worden war (Tab. 17), erfolgte die Transkription über 1 h bei 37° C. Der Reaktionsansatz wurde für 10 Minuten auf 70° C erhitzt, um die Reaktion zu stoppen und anschließend auf Eis gekühlt.

Tab. 17: Der Ansatz die Herstellung von cDNA

<b>Mastermix</b>	<b>Volumen</b>
5X Reaction Puffer	4 µl
Oligo (dT) Primer, 20 µM	2 µl
RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor	1 µl
M-MuLV Reverse Transcriptase	2 µl

#### 4.2.10 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Nach dem Auftauen, Vortexen und Zentrifugation wurden die cDNA und die zur RT-PCR benötigten Reagenzien und Oligonukleotide (Tab. 18) eiskühlt. Die benötigten Komponenten und die oben vorbereitende cDNA von MCF7pc3 -sf3 und T47Dpc3 -sf3 wurden in der Reihenfolge des folgenden Pipettierschema in sterile, DNase- und RNase-freie PCR-Gefäße pipettiert (Tab. 19). Als Negativkontrolle wurde anstatt der cDNA 1 µg RNA verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden mit dem nachfolgendem Temperaturprogramm durchgeführt (Tab. 20). Die Proben wurden auf einem 1,5 % igen Agarosegel analysiert (Abb. 14-15) und bei -20° C gelagert. Das zu erwartende Amplifikat mit einer Größe von 306 Bp ließ sich in den SOAT transfizierten Zellen nachweisen.

Tab.18: Oligonukleotide zum Nachweis der vektoriellen DNA-Sequenzen im Genom der stabil transfizierten Zelllinien

Primer	Sequenz
hSOAT-Kassette f	5'-CAGATGTTGAGTTTCCCACTG-3'
hSOAT-Kassette r	5'-CTACTTATCGTCGTCATCCTTG-3'

Tab. 19: Pipettierschema für die RT-PCR

Komponente	Volumen
cDNA	5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
MgCl <sub>2</sub>	3 µl
Primer forward (10 µM)	1 µl
Primer reverse (10 µM)	1 µl
10 x PCR-Puffer (KCl)	5 µl
H <sub>2</sub> O bidest. steril (DEPC)	33,75 µl
Taq-Polymerase	0,25 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tab. 20: RT-PCR-Protokolle für den Nachweis der stabilen Integration der Vektoren in das Genom der Zelllinien.

PCR	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Hybridisierung	Polymerisierung	Finale Polymerisierung
Expressionsvektor und Kontrolle SOATF3/pcDNA3.1(+)	94° C, 2'00''	94° C, 30''	58° C, 30''	72° C, 1'00''	72° C, 5'00''
31 Zyklen					

#### 4.2.11 Quantitative RT-PCR

Das Expressionsniveau der mRNA wurde auch mittels quantitativer *real-time* PCR der durch reverse Transkription erhaltenen cDNA mit einem Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System bestimmt. Die quantitative Real Time PCR zur Bestimmung der Expression von SOAT, Sulfatase, Estrogenrezeptor- $\alpha$  und - $\beta$  erfolgte mittels des TaqMan-Sonden-Verfahrens. Das Prinzip dieser Methode basiert auf einer Detektion und Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit (real time) während der Amplifikation. Es ermöglicht, aus mRNA mehrere Gene gleichzeitig zu untersuchen. Hierzu wurde für jedes Gen eine fluorogene Sonde konstruiert, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher trägt. Kommt es zur Polymerisierung der Nukleinsäure ausgehend von dem Primer wird der Quencher abgespalten und das Fluorogen kann detektiert werden.

Die aus der Standardreihe erhaltenen relativen Konzentrationen wurden für jede Probe auf die relative Konzentration von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder  $\beta$ -Aktin (ACTB) als Standard bezogen. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung ausgeführt. Bei jedem PCR-Lauf wurde eine NTC (*No Template Control*, Kontrolle ohne cDNA, Wasser-Kontrolle) mitgeführt. Die Primer wurden von Applied Biosystems (Darmstadt) bezogen (Tab. 21). Die Messung wurden mithilfe des Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System durchgeführt. Die Temperaturbedingungen waren bei jedem Lauf identisch und sind in Tabelle 22 aufgeführt.

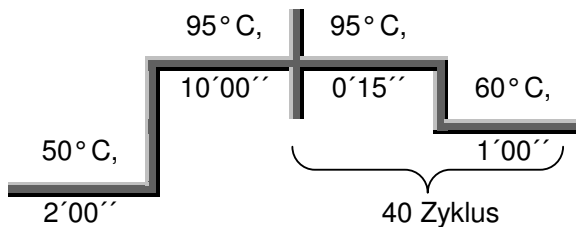
Das Zusammenpipettieren der Reaktionsansätze, wie in Tabelle 23 gezeigt wird, und die Verteilung auf die 96-well-Platte (MicroAmp™ aus Applied Biosystems) erfolgte unter laminarem Luftfluss. Nach Verschluss der Platte mit einer Folie wurde die Platte bei 400 x g zentrifugiert (TZ-25 Centrifuge—Beckman Coulter) und direkt danach im Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System -Gerät gestartet. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit Hilfe Microsoft Excel® 2003 und die Ergebnis wurde die Abbildung 15 gezeigt.



Tab. 21: Verwendete Primer (Applied Biosystems) für die quantitative RT-PCR

Primer für	Bestellungsnummern aus Applied Biosystems
SOAT	Hs01399354
Sulfatase	Hs00165853
Estrogen receptor- $\alpha$	Hs00174860
Estrogen receptor- $\beta$	Hs00230957
ACTB	HS9999903

Tab. 22: Temperaturbedingungen für den Reaktionsansatz der quantitativen RT-PCR



Tab. 23: Pipettierschema für den Reaktionsansatz der quantitativen RT-PCR

Reagenz	SOAT	Sulfatase	ER- $\alpha$	ER- $\beta$
TaqMan universal PCR mix	12,5 $\mu$ l	12,5 $\mu$ l	12,5 $\mu$ l	12,5 $\mu$ l
Assay*	1,25 $\mu$ l	1,25 $\mu$ l	1,25 $\mu$ l	1,25 $\mu$ l
cDNA	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	6,25 $\mu$ l	6,25 $\mu$ l	6,25 $\mu$ l	6,25 $\mu$ l
Gesamtvolumen	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l

\* Assay enthalten Sonden und spezifische Forward und Reverse Primer

#### 4.2.12 Transportassay in SOAT-transfizierten MCF7 und T47D mit radioaktiv markierten Substanzen

Um die Funktionalität des Proteins zu zeigen, sollte diese durch einen Transportassay demonstriert werden können. Die Transportaktivität sollte mit den [<sup>3</sup>H]-markierten SOAT-Substraten E<sub>1</sub>S und DHEAS nachgewiesen werden.

Die MCF7sf3- und MCF7pc3-Sammelklone wurden mit einer Zelldichte von 7800 Zellen pro Well, die T47Dsf3- und T47Dpc3-Sammelklone sowie der T47Dsf3-Einzelklon und mit einer Zelldichte von 21800 Zellen pro Well in 12-Wellplatten plattiert. Die unterschiedliche Zellzahl ergibt sich aus der Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien. Die MCF7-Zelllinien zeigten ein

wesentlich schnelleres Wachstum, so dass, um eine gleichzeitige Konfluenz zu erreichen, von den MCF7-Zelllinien eine geringere Anzahl Zellen plattiert werden konnte. Nach Kultivierung über 3 Tage fand die Transportmessung statt. Da der SOAT eine Natrium-abhängige Transportaktivität zeigt, wurden die Transportmessungen in einem Puffer mit 142,9 mM Natrium ( $+Na^+$ ) und einem Natrium-freien ( $-Na^+$ ) Puffer durchgeführt. Die Zellen wurden in verschiedenen Konzentrationen [ $^3H$ ]E<sub>1</sub>S und [ $^3H$ ]DHEAS -Lösung (Tab. 24) inkubiert.

Tab. 24: Messbedingungen für den Transportassay

<b>Substanzen</b>	<b>MCF7pc3 Sammelklon</b>	<b>T47Dpc Sammelklon</b>
	<b>MCF7sf3 Sammelklon</b>	<b>T47Dsf3 Sammelklon</b>
[ $^3H$ ]DHEAS	25, 50, 100, 200 nM für 10 min	25, 50, 100, 200 nM für 10 min
[ $^3H$ ]E <sub>1</sub> S	25, 50, 100, 200 nM für 10 min	1, 10, 100 nM für 30 min

#### Lösungen:

##### Na<sup>+</sup>-haltiger Transportpuffer:

<b>Substanzen</b>	<b>Konzentration</b>	<b>g/l</b>
NaCl	142,9 mM	8,35
KCl	4,7 mM	0,35
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1,2 mM	0,296
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM	0,163
Hepes	20 mM	4,777
CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM	0,2646

##### Na<sup>+</sup>-freier Transportpuffer:

<b>Substanzen</b>	<b>Konzentration</b>	<b>g/l</b>
C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> NO Cl (Cholinchlorid)	19,95 mM	9,975
KCl	4,7 mM	0,35
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1,2 mM	0,296
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM	0,163
Hepes	20 mM	4,777
CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM	0,2646

Radioaktive Substanzen:

Substanz	Spezifische Aktivität
[ <sup>3</sup> H]DHEAS	1,0 mCi/ml, 74,0 Ci/mmol
[ <sup>3</sup> H]Estron-3-sulfat	1,0 mCi/ml, 57,3 Ci/mmol

Lysispuffer:

Substanzen	Menge
1N NaOH	40,01 g
0,1 %SDS	10 ml
ddH <sub>2</sub> O	990 ml

Reagenzen für Proteinbestimmung:

Lösung A: 2 %ige Lösung von Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + K.Na-Tartrat in 0,1 N NaOH

Lösung B: 0,5%ige Lösung von CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O

Lösung C: 50 ml Lösung A + 1 ml Lösung B

Folin-Reagenz (1:4 verdünnt)

Die plattierten Zelllinien wurden in dem jeweiligen [<sup>3</sup>H]DHEAS- oder [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S-freien Transportpuffer gewaschen. Zu diesem Zweck wurden sie mit einer Pipette in etwa 0,5 ml/Well der entsprechenden Lösung überführt und leicht geschwenkt. Die überstehende Waschlösung wurde mit einer Pipette möglichst vollständig abgesaugt und die Zellen wurden mit 500 µl Transportpuffer überschichtet. Zum Beginn der Messung wurden 50 µl Inkubationsmedium mit 1-200 nM [<sup>3</sup>H] DHEAS oder [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S zugegeben. Die Zellen wurden auf einer Wärmeplatte bei 37° C 10-30 min inkubiert. Danach wurden die [<sup>3</sup>H]DHEAS- und [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S-Aufnahme durch drei Maßnahmen beendet: Der Transportpuffer wurde mit einer Pipette möglichst vollständig abgesaugt und in ein Gefäß überführt. Der Transport wurde durch Zugabe von eiskaltem PBS gestoppt. Zusätzlich wurde eine Zeit-abhängig-Aufnahme für 10-60 Minuten unter Ab- und Anwesenheit von Na<sup>+</sup> durchgeführt. Der Transport wurde durch Zugabe von eiskaltem PBS gestoppt und die Zellen in 500 µl 1 N NaOH/0,1 % SDS lysiert. Die zellassoziierte Radioaktivität wurde in einem 300 µl Aliquot nun in so genannte Minivials überführt. Die Zellsuspension wurde mit jeweils 3 ml der Szintillationsflüssigkeit versenkt und gevortext. Die Radioaktivität wurde im Liquid Scintillation Counter (Wallac 1409 Pharmacia) ermittelt. Um die Substanzmenge errechnen zu können, die die Zellen aufgenommen hatten, wurde mit je dreimal 10 µl der Messlösungen ebenso verfahren. Aus

diesen Standards mit bekannter Menge an [ $^3\text{H}$ ] DHEAS- oder [ $^3\text{H}$ ]E<sub>1</sub>S ließen sich die Menge an aufgenommenem [ $^3\text{H}$ ] DHEAS- bzw. [ $^3\text{H}$ ]E<sub>1</sub>S berechnen.

Die aufgenommene Substratmenge wurde auf den Proteingehalt der Probe, bestimmt nach Lowry, bezogen. Hierfür wurden 20 µl Aliquot der lysierten Zellen in 96 Well-Platten pipettiert und darauf 200 µl Lösung C gegeben. Nach 15 Minuten wurden 40 µl Folin-Reagenz zugegeben und für 1-2 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Farbumschlag durch den Bio-Rad Microplate Reader (Benchmark) gemessen.

Die Daten wurden durch Microsoft Excel 2003 von dpm zu fmol/µgProtein umgerechnet und durch Graphpad Prism 4 statistisch analysiert.

#### 4.2.13 Proliferationsassay bei SOAT-transfizierten MCF7 und T47D durch den Einbau von [ $^3\text{H}$ ]Thymidin

Medien:

##### Estrogen-freies Zellkulturmedium für den Proliferationsassay

D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ohne Phenolrot	46 %
F-12 Nutrient Mixture (HAM) + Glutamin	46 %
Estrogen-freies FKS*	1, 3, 5 oder 10 %
L-Glutamin (200 mM)	2 %
Penicillin/Streptomycin **	1 %

\* Dextran-Charcoal behandelt oder dialysiertes FKS

\*\*Penicillin; 10.000 U/ml, Streptomycin; 10mg/ml

Lysispuffer: (Kap. 4.2.12)

Poly-L-Lysin:

0,1mg/ml Poly-L-Lysinhydrobromid in PBS

DCC-FKS:

Pro 100 ml FKS wurden 0,5 g Dextran-Charcoal (DCC) zugegeben und für 24 h bei 4° C inkubiert. Das Serum wurde durch einen Faltenfilter (MN615 ¼- Mancherey-Nagel, Düren) filtriert. Das Filtrat wurde weitere drei Mal wie oben behandelt. Das letzte Filtrat wurde sterilfiltriert (0,22 µm), unter sterilen Bedingungen in Aliquots abgefüllt und bei -20° C gelagert.

Substanzen:

<b>Substanzen</b>	<b>Molekulargewicht (g/mol)</b>
β-Estradiol	272,39
E <sub>1</sub> S	388,5
DHEAS	390,5

Die Zellen wurden in einem Proliferationsassay auf ihr Proliferationsverhalten unter verschiedener DHEAS- und E<sub>1</sub>S-Einwirkung untersucht. Dieser Assay wurde im 24-Well-Format durchgeführt. Die 24-Wellplatten wurden mindestens 10 min mit 250 µL Poly-L-Lysin bei 37° C inkubiert. Nach der Beschichtung wurde Poly-L-Lysin von der Well von der Platten rausgenommen. Zur Etablierung der Methode mussten folgende Fragen geklärt werden:

- Das in der Zellkultur üblicherweise eingesetzte FKS enthält Estrogene. Dieser Estrogengehalt stört in einem Estrogen-Proliferationsassay. Daher musste in dem Assay FKS eingesetzt werden, aus dem die Estrogene entfernt waren. Es boten sich zwei Alternativen an. Zum einen kommerziell erhältliches, dialysiertes FKS (PAA, Cölbe), zum anderen die Entfernung der Estrogene durch Behandlung des FKS mit Aktivkohle (Dextran-Charcoal, DCC Sigma). Beide Seren wurden parallel in verschiedenen Konzentrationen (1 %, 3 %, 5 %, 10 %) überprüft.
- Als Negativ-Kontrolle wurden die Zellen in dem Estrogen-freien Medium kultiviert. Als Positiv-Kontrolle sollten die Zellen mit Estradiol stimuliert werden. Zur Ermittlung der Estradiol-Konzentration, welche die maximale Proliferationsaktivität hervorruft, wurde Estradiol in Konzentrationen von  $10^{-12}$  bis  $10^{-6}$  M eingesetzt.
- Estradiol hat eine hohe Proteinbindung. Daher ist die Menge des Estradiols, das für die Zellen verfügbar ist, vom FKS-Gehalt des Mediums abhängig.

Um die genannten Parameter zu optimieren wurden sie in einem parallelen zweidimensionalen Versuchsansatz geklärt (Abb. 20). Dies erfolgte exemplarisch an der Zelllinie T47Dpc3.

Vor dem Pflanzieren der Zellen in die 24-Well-Platten wurden sie 4 Tage in Estrogen-freiem Medium kultiviert, um sie von den Estrogenen des konventionellen Zellkulturmediums zu befreien. Bei dieser Vorbehandlung wurde Medium, das entweder 10 % dialysiertes FKS oder 10 % Dextran-Charcoal-behandeltes FKS (DCC-FKS) enthielt, eingesetzt. Am Tag der Aussaat wurden die Zellen aus der Vorbehandlungskultur nach PBS-Waschung, Abtrypsinisierung und Zählung zu jeweils 10 000 Zellen pro Well in 0,5 ml Medium in die 24-Wellplatten ausgesät. Das Medium enthielt 1 %, 3 %, 5 % oder 10 % des dialysierten oder DCC-FKS. Diesen Medien wurde Estradiol, gelöst in DMSO, in Konzentrationen von  $10^{-12}$  bis  $10^{-6}$  M zugesetzt. Die Endkonzentration an DMSO betrug 0,2 % (1 µl/500 µl Medium). Die negativ Kontrolle enthielt nur das Lösungsmittel.

Vor Erreichen der Konfluenz musste die Proliferation bestimmt werden. Dieser Punkt war nach 7 Tagen erreicht. Dann wurde die Proliferation durch den Einbau von [<sup>3</sup>H]Thymidin in die DNA während der DNA-Replikation quantifiziert. Pro Well wurde 1 µCi [<sup>3</sup>H]Thymidin mit einer spezifischen Aktivität von 86 Ci/mmol dem Medium zugegeben. Die [<sup>3</sup>H]Thymidin-

Inkorporation erfolgte über 2 h unter Standard-Zellkulturbedingungen. Im Anschluss wurden die Zellen fünfmal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 500 µl Lysispuffer über 2 h lysiert. Die Menge des inkorporierten [<sup>3</sup>H]Thymidins wurde durch Messung der Radioaktivität in einem 300 µl-Aliquot im Liquid Scintillation Counter bestimmt.

Es stellte sich heraus, dass die stabilsten Ergebnisse bei einem Gehalt von 5 % DCC-FKS zu erreichen waren. Diese DCC-FKS-Konzentration wurde bei den folgenden Versuchen eingesetzt.

Als Positivkontrolle für die Estrogen-abhängige Proliferation werden in der Literatur verschiedene Estradiol-Konzentrationen von  $10^{-12}$  (Nozawa et al. 2004-A) über  $3 \times 10^{-11}$  (Papendorp et al. 1985) bis  $10^{-8}$  M (Le Bail et al. 1998) beschrieben. Meine Versuche ergaben, dass die Proliferation unter Konzentrationen von  $10^{-11}$  bis  $10^{-10}$  zwar anstieg, das Maximum der Proliferation aber bei  $10^{-9}$  mol/l erreicht wurde. Daher wurden die Positivkontrollen in den folgenden Versuchen doppelt durchgeführt, einmal mit  $5 \times 10^{-11}$  und einmal mit  $10^{-9}$  mol/l Estradiol.

Mit den so gewonnenen Erkenntnissen wurde der Assay für die weiteren Proliferationsstudien unter der Einwirkung von DHEAS und E<sub>1</sub>S untersucht. Die Steroidsulfate wurden in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-4}$  bis  $10^{-12}$  verwendet.

Die Zelllinien für 4 Tage in Estrogen-freiem Medium mit 5 % DCC-FKS von Estrogenen befreit. Dann wurden in 24-Wellplatten zu 10 000 Zellen pro Well in 0,5 ml Estrogen-freiem Medium plattiert. Dem Medium wurde nach 24 h DHEAS ( $10^{-12}$ - $10^{-4}$  M), E<sub>1</sub>S ( $10^{-12}$ - $10^{-4}$  M), Estradiol ( $5 \times 10^{-11}$  und  $10^{-9}$  M) oder nur das Lösungsmittel DMSO (0,2 %) zugesetzt. Der Versuch wurde mit einer Probenanzahl (n) von 4 durchgeführt.

Die Proliferation der T47D-Zelllinien wurde nach 7 Tagen durch den [<sup>3</sup>H]Thymidin-Einbau bestimmt. Da die MCF7-Zellen aufgrund ihres schnelleren Wachstums die Konfluenz früher erreichten, wurde der [<sup>3</sup>H]Thymidin-Einbau bei diesen Zellen bereits nach 4 Tagen bestimmt.

#### **4.2.14 Hemmung der SOAT-vermittelten Proliferationssteigerung**

Um die gesteigerte E<sub>1</sub>S-Sensitivität der SOAT-transfizierten Klone eindeutig der Transport-Aktivität des SOAT zuzuordnen, wurde mit einigen SOAT-Inhibitoren versucht, den beobachteten Effekt aufzuheben. Zum Einsatz kamen hier Bromsulphthalein (BSP), α-Naphtyl-Sulfat, Sulfotaurolithocholat (TLCS) sowie 2- und 4-Sulfooxymethylpyren (2-SMP, 4-SMP). Um eindeutig zu zeigen, dass die E<sub>1</sub>S-stimulierte Proliferation über den Estrogenrezeptor α vermittelt wird und die sulfatierten Steroide Quelle der Estrogenwirkung

sind, wurden noch Hemmversuche unter Anwesenheit des Estrogenrezeptor Antagonisten Tamoxifen und des Steroid-Sulfatase (STS) -Inhibitors STX 64 (667 Coumate) durchgeführt.

Diese Versuche wurden bei einer  $E_1S$ -Konzentration von  $10^{-8}$  oder  $10^{-9}$  M für die Zelllinien T47Dpc3 und -sf3 Sammelklon durchgeführt. Als Positiv-Kontrollen dient wieder  $10^{-9}$  M Estradiol, als Negativ-Kontrolle das Lösungsmittel. Die Proliferation wurde unter verschiedenen  $E_1S$ -Konzentrationen (BSP,  $\alpha$ -Naphthyl-Sulfat) oder zeitabhängig bei  $10^{-8}$  M  $E_1S$  (TLCS, 2-, 4-SMP) bestimmt.

#### Hemmversuche mit BSP und $\alpha$ -Naphthyl-Sulfat:

Die Zelllinien T47Dpc3 Sammelklon und T47Dsf3 Sammelklon wurden durch Kultur für 4 Tage in Estrogen-freiem Medium von Estrogenen befreit. Dann wurden die Zellen in Polylysin-L-beschichtete 24-Well-Platten mit einer Probenanzahl (n) von 4 und einer Zellzahl von 10.000 pro Well in 0,5 ml Estrogen-freiem Medium plattiert. Am folgenden Tag wurden die Substanzen, gelöst in DMSO, zugesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurden  $5 \times 10^{-11}$  und  $10^{-9}$  M Estradiol eingesetzt, als Negativ-Kontrolle das Lösungsmittel. BSP wurde in einer Konzentration von 5  $\mu$ M eingesetzt,  $\alpha$ -Naphthyl-Sulfat von 10  $\mu$ M. Die Proliferation der Zelllinien wurde unter der Einwirkung von  $E_1S$  im Konzentrationsbereich von  $10^{-4}$  bis  $10^{-12}$  M über 6 Tage bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte über [ $^3$ H]Thymidin-Einbau (siehe oben).

#### Hemmversuche mit TLCS, 2- und 4-SMP, dem Estrogenrezeptor $\alpha$ -Antagonist Tamoxifen und dem STS-Inhibitor STX64:

Die Zelllinien T47Dpc3 Sammelklon und T47Dsf3 Sammelklon wurden durch Kultur für 4 Tage in Estrogen-freiem Medium von Estrogenen befreit. Dann wurden die Zellen in beschichtete 24-Well-Platten mit einer Probenanzahl (n) von 4 und einer Zellzahl von 20.000 pro Well in 0,5 ml Estrogen-freiem Medium plattiert. Am folgenden Tag wurden die Substanzen, gelöst in DMSO, zugesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurden  $5 \times 10^{-11}$  und  $10^{-9}$  M Estradiol eingesetzt, als Negativ-Kontrolle das Lösungsmittel.  $E_1S$  wurde in einer Konzentration von  $10^{-8}$  M verwendet. TLCS, 2- und 4-SMP wurden in einer Konzentration von 25  $\mu$ M, Tamoxifen und STX64 in einer Konzentration von 5  $\mu$ M zugegeben. Die Proliferation wurde beim Einsatz der SOAT-Inhibitoren ab dem 2. Tag bis zum 6 Tag alle 24 h durch [ $^3$ H]Thymidin-Einbau bestimmt (siehe oben), beim Einsatz von Tamoxifen und STX64 am 7. Tag.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Klonierung der Vektoren

#### 5.1.1 hSOATF3

Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung des SOAT für die Proliferation Estrogen-abhängiger Mammatumore am Modell der Brustkrebs-Zelllinien T47D und MCF7 zu klären. Dafür musste die Proliferation der Zelllinien nach Überexpression und knock down des SOAT unter Anwesenheit der sulfatierten Steroide E<sub>1</sub>S und DHEAS mit der SOAT-Expression korreliert werden. In diesem Zusammenhang wurde die cDNA des humanen SOAT (hSOAT) über *HindIII* und *XbaI* in pcDNA3.1(+) kloniert (Kap. 4.2.1.7).

Zur Klonierung wurden die über *HindIII* und *XbaI* geschnittene Fragmente pcDNA3.1(+) und SOATF auf einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Gelextraktion aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wurden die Fragmente in einer analytischen Agarosegel-Elektrophorese überprüft (Abb. 5).

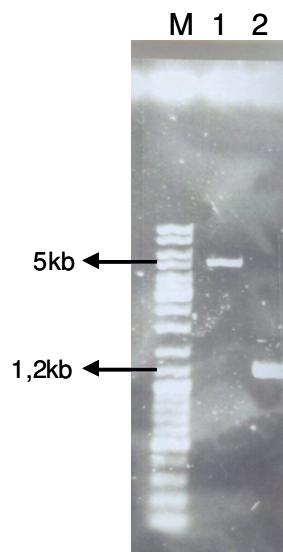


Abb. 5: Agarosegel-Elektrophorese der pcDNA3.1(+)- und hSOATFlag-Fragmente nach Verdau mit *HindIII* und *XbaI* und Gelextraktion. **M**: GeneRuler DNA-Ladder Mix®, **1**: pcDNA3.1(+) (5437Bp), **2**: SOATF (1158Bp)



Nach der Transformation in *E.coli* und Präparation der Plasmid-DNA waren für SOATF3 nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Sma*I die erwarteten Fragmente von 4446 Bp und 1948 Bp nachweisbar (Abb. 6).

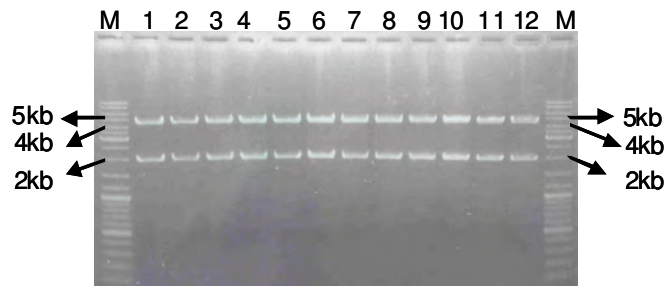


Abb. 6: Agarosegel-Elektrophorese zur Analyse der entstandenen Plasmide nach Klonierung des SOATFlag in pcDNA3.1(+). Die gewonnene Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Sma*I verdaut. Die Fragmente zeigten die erwartete Größe von 4446 und 1948 Bp. **1-12**: untersuchte Klone, **M**: GeneRuler DNA-Ladder Mix®.

### 5.1.2 SOATi2Neo4 und SOATiKontrolle1Neo4

Um eine adäquate Kontrolle für das bereits bestehende Plasmid SOAT2-RNAi zu erhalten, wurde die randomisierte Sequenz der SOAT-spezifischen shRNA in den Vektor psiSTRIKE-hMGFP® (Promega) kloniert (SOATi-Kontrolle) und, um eine stabile Transfektion von Zellen zu ermöglichen, in die RNAi-Plasmide zusätzlich das Neomycin-Resistenzgen (PGK\_Neo<sup>R</sup>-Kassette) in eine *Kpn*I-Schnittstelle bei der Position von 2442 kloniert. Nach Verdau der Ausgangsplasmide mit *Kpn*I und Gelextraktion zeigten die gewonnenen Fragmente die erwartete Größe von 5072 Bp (SOAT2-RNAi und SOATi-Kontroll) und 2092 Bp (PGK\_Neo<sup>R</sup>-Kassette (Abb. 7)).

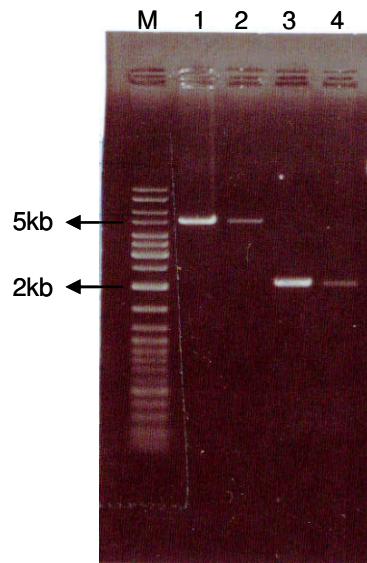


Abb. 7: Agarosegel-Elektrophorese der SOAT-RNAi-Vektorenfragmente und Neomycin-Kassette nach Verdau mit *KpnI* und Gelextraktion. Die Fragmente zeigten die erwartete Größe für SOAT2-RNAi und SOATi-Kontrolle von 5072 Bp und für PGK\_Neo<sup>R</sup>-Kassette von 2092 Bp. **M**: GeneRuler DNA-Ladder Mix®, **1**: SOAT-RNAi (5072 Bp), **2**: 1:10-Verdünnung von SOAT-RNAi **3**: Neomycin-Kassette (2092 Bp), **4**: 1:10-Verdünnung von Neomycin-Kassette.

Nach Gelextraktion und Reinigung wurden sie miteinander ligiert (Kap. 4.2.1.7) und in elektrokompente HB101 *E.coli* durch Elektroporation transformiert. Dann wurden nach Picken der Kolonien und Animpfen von Übernachtskulturen Plasmid-Präparationen im Mini-Maßstab und mit der gewonnenen Plasmid-DNA ein analytischer Verdau (*SalI* und *BglII*) durchgeführt. Die erhaltenen Fragmente wurden durch Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Die PGK\_Neo<sup>R</sup>-Kassette konnte in zwei Orientierungen in das Plasmid integrieren. Die Orientierung ließ sich über den Doppelverdau mit *BglII* und *SalI* identifizieren. Bei Orientierung in der gewünschten 5'-3'Richtung der shRNA-Kassette entstehen Restriktionsfragmente von 3968, 3023 und 220 Bp (Abb. 8, Spur 4; Abb. 9, Spur 1). Wurde das Fragment in der entgegengesetzten Orientierung integriert zeigten sich Fragmente der Größen 4700, 2260 und 220 Bp. Die gewonnenen Plasmide mit der gewünschten Orientierung wurden als SOATi2Neo4 und SOATiKontroll1Neo4 (4 steht jeweils für den vierten analysierten Klon) bezeichnet.

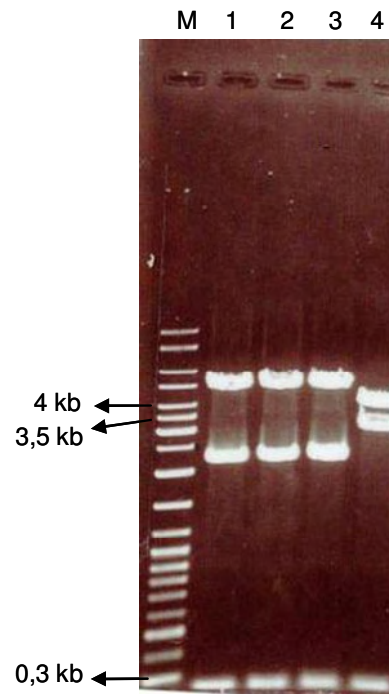


Abb. 8: Agarosegel-Elektrophorese zur Analyse der entstandenen Plasmide nach Klonierung des Neomycin-Resistenzgens in SOAT2-RNAi nach Verdau mit *SalI* und *Bgl* II. Spur 4 zeigt den Klon mit der gewünschten Orientierung (3968, 3023 und 220 Bp); 1-3: Klone in falscher Orientierung; M: GeneRuler DNA-Ladder Mix®.

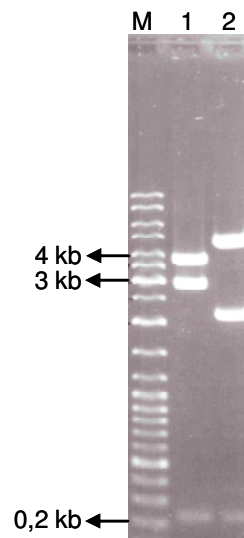
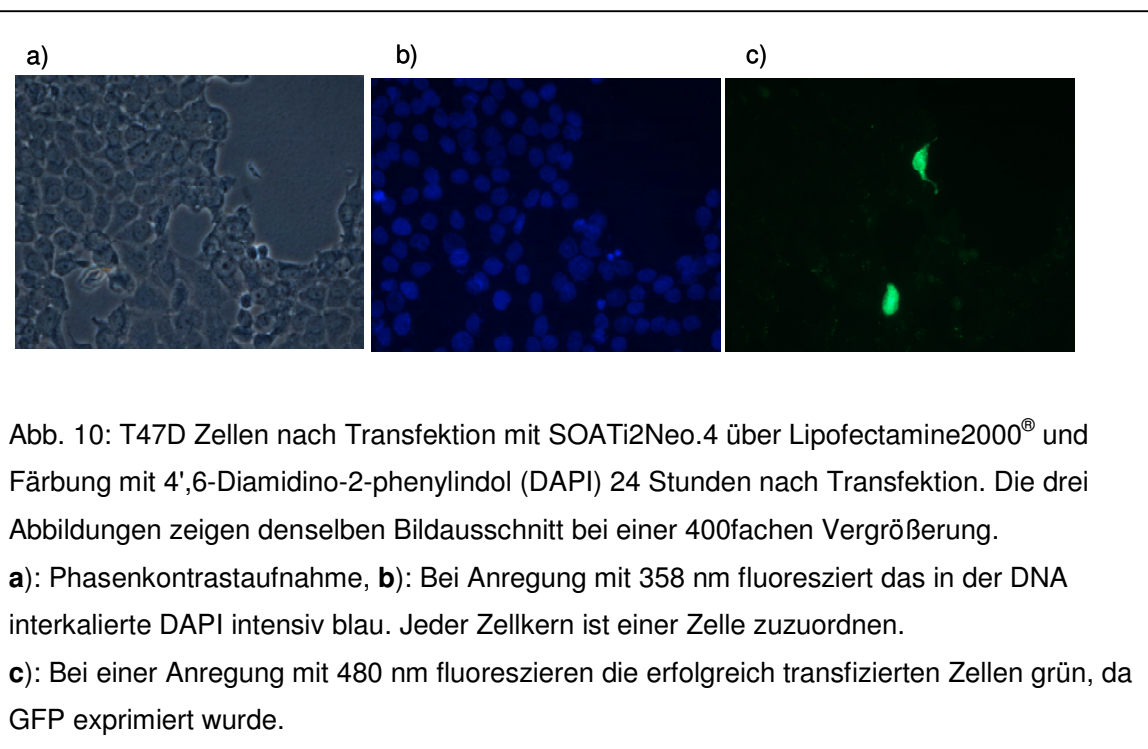


Abb. 9: Agarosegel-Elektrophorese zur Analyse der entstandenen Plasmide nach Klonierung des Neomycin-Resistenzgens in den SOATiKontroll-Vektor. Die Plasmid DNA wurde verdaut mit *SalI* und *Bgl* II. Spur 1 zeigt den Klon mit der gewünschten Orientierung; Spur 2: falsche Orientierung; M: GeneRuler DNA-Ladder Mix®.

## 5.2 Stabile Transfektion der Zelllinien MCF7 und T47D

Mit den konstruierten Plasmiden wurden MCF7- und T47D-Zellen stabil transfiziert. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Prinzipien erprobt: die Elektroporation und die chemische Transfektion.

Die Transfektionseffizienz der Methoden konnte durch den eingesetzten shRNA-Vektor überprüft werden, da in dem Plasmid zusätzlich eine Expressionskassette für das Green-Fluorescent-Protein enthalten ist. Dieses Protein fluoresziert bei Anregung mit 480 nm grün (515 nm). Nach Anfärbung der DNA des Zellkerns mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), das bei 358 nm Anregung mit 400 nm fluoresziert, konnte die Zellzahl in einem Bildausschnitt bestimmt und der Zahl der GFP-positiven Zellen gegenüber gestellt werden. Dies zeigt exemplarisch Abb. 10.



Für beide Zelllinien zeigte sich, dass die Elektroporation den chemischen Transfektionsmethoden überlegen ist. Daher wurde anschließend für die stabile Transfektion die Elektroporation eingesetzt. Die Bezeichnung der gewonnenen Zelllinien nach der stabilen Transfektion zeigt Tabelle 13.

## 5.3 Nachweise der Integration der Vektoren in das Genom

### 5.3.1. Ergebnis der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Über eine PCR mit der genomischen DNA der gewonnenen Zelllinien als Template und den in Tabelle 14 gezeigten Oligonukleotiden gelang der Nachweis der Integration der vektoriellen DNA-Sequenz in das Genom der stabil transfizierten Zelllinien. Beide Primer binden spezifisch in der für die shRNA-Kassette und hSOAT-Kassette kodierenden Region. Tabelle 25 zeigt die Zellklone, die in den folgenden Untersuchungen eingesetzt wurden.

Tab. 25: Untersuchte Zellkonen bei denen der Nachweis der Integration der Vektoren in das Genom gelang. n.d.: nicht durchgeführt. Die weiteren Versuche wurden mit T47Dsi Sammelklon1, MCF7si Sammelklon2, T47Dsf3 Sammelklon, T47Dsf3 Einzelklon, MCF7sf3 Sammelklon durchgeführt. Q RT-PCR: quantitative real time PCR

<b>SOATi2Neo4</b>	<b>PCR</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>Q RT-PCR</b>
<b>transfizierte Zellklonen</b>			
T47Dsi Sammelklon1	+	n.d.	n.d.
T47Dsi Sammelklon2	+	n.d.	n.d.
T47Dsi Sammelklon3	+	n.d.	n.d.
T47Dsi Sammelklon4	-	n.d.	n.d.
T47Dsi Sammelklon5	-	n.d.	n.d.
T47Dsi Sammelklon6	+	n.d.	n.d.
T47Dsi Sammelklon7	+	n.d.	n.d.
MCF7si Sammelklon1	-	n.d.	n.d.
MCF7si Sammelklon2	+	n.d.	n.d.
MCF7si Sammelklon3	+	n.d.	n.d.
MCF7si Sammelklon4	-	n.d.	n.d.
<b>SOATF3 transfizierte</b>	<b>PCR</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>Q RT-PCR</b>
<b>Zellklonen</b>			
T47Dsf3 Sammelklon	+	+	+
T47Dsf3 Einzelklon	n.d.	n.d.	+
MCF7sf3 Sammelklon	+	+	n.d.
MCF7sf3 Einzelklon1	n.d.	-	n.d.
MCF7sf3 Einzelklon2	n.d.	-	n.d.
MCF7sf3 Einzelklon3	n.d.	+	n.d.
MCF7sf3 Einzelklon4	n.d.	+	n.d.

Nachdem genomische DNA präpariert war, wurden 250 ng DNA und als Positiv-Kontrolle 0,5 ng Plasmid-DNA SOATi2Neo4, bzw. pcDNA3.1(+) oder SOATF3 in der PCR verwendet und die Fragmente über 35 Zyklen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 %-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Es wurden Amplifikate einer Größe von 450 Bp für die shRNA-Vektoren erwartet (Abb. 11-12). Für die Ausgangszelllinie MCF7 waren diese in den Ansätzen der Klone MCF7si Sammelklon2, MCF7si Sammelklon3 und MCF7sk Sammelklon nachweisbar (Abb. 11). Die Proliferationsstudien wurden mit dem Klon MCF7si Sammelklon2 durchgeführt.

In den T47D-Linien zeigten sich die gewünschten Amplifikate in den Ansätzen der Linien T47Dsi Sammelklon1, 2, 3, 6, und 7 (Abb. 12). Hier wurden die Proliferationsstudien mit dem Klon T47Dsi Sammelklon1 durchgeführt.

Die erwartete Amplifikatgröße für den Nachweis des Vektors SOATF3 beträgt 2,2 kb, für den Nachweis des Vektors pcDNA3 1 kb. Amplifikate für SOATF3 waren in den Ansätzen der Linien T47Dsf3 Sammelklon und MCF7sf3 Sammelklon nachweisbar, die 1 kb-Amplifikate des pcDNA3 in den Ansätzen der Linien T47Dpc3 Sammelklon und MCF7pc3 Sammelklon (Abb. 13).

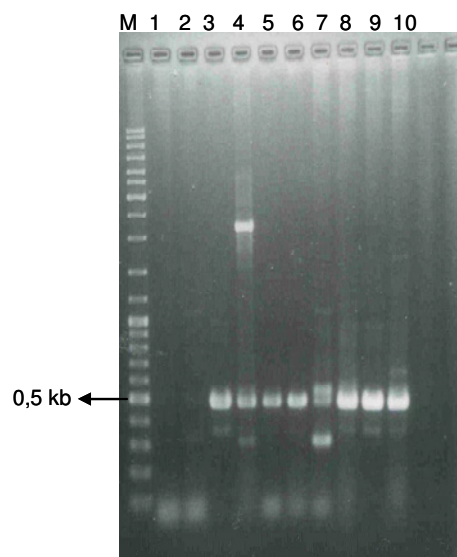


Abb.11: Amplifikate der PCRs für den Nachweis der shRNA-Vektoren in den transfizierten MCF7-Zelllinien. Die zu erwartende Größe der Amplifikate beträgt 450 Bp. **M:** Gene Ruler® DNA Lader Mix, **1:** Wasserkontrolle, **2:** Negativ-Kontrolle (genomische DNA von MCF7-Wildtyp), **3:** Positiv-Kontrolle (Plasmid DNA SOATi2Neo4), **4:** Genomische DNA MCF7si Sammelklon1, **5:** Genomische DNA MCF7si Sammelklon2, **6:** Genomische DNA MCF7si Sammelklon3, **7:** Genomische DNA MCF7si Sammelklon4, **8** und **9:** Positiv-Kontrolle (Plasmid DNA SoatiKontroll1Neo4), **10:** Genomische DNA MCF7sk Sammelklon.

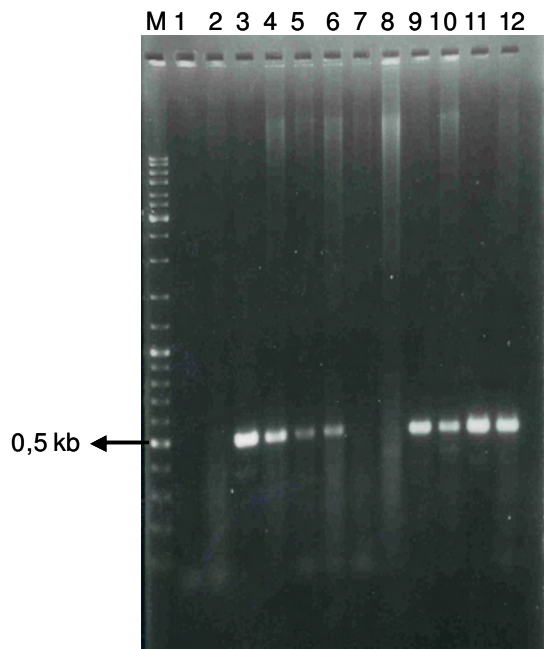


Abb. 12: Amplifikate der PCRs für den Nachweis der shRNA-Vektoren in den transfizierten T47D-Zelllinien. Die zu erwartende Größe der Amplifikate beträgt 450 Bp. **M:** Gene Ruler® DNA Lader Mix, **1:** Wasserkontrolle, **2:** Negativ-Kontrolle (genomische DNA von T47D-Wildtyp), **3:** Positiv-Kontrolle (Plasmid DNA SOATi2Neo4), **4:** Genomische DNA T47Dsi Sammelklon1, **5:** Genomische DNA T47Dsi Sammelklon2, **6:** Genomische DNA T47Dsi Sammelklon3, **7:** Genomische DNA

T47Dsi Sammelklon4, **8:** Genomische DNA T47Dsi Sammelklon 5, **9:** Genomische DNA T47Dsi Sammelklon 6, **10:** Genomische DNA T47Dsi Sammelklon 7, **11:** Positiv-Kontrolle (Plasmid DNA SoatiKontroll1Neo4), **12:** Genomische DNA T47Dsk Sammelklon.

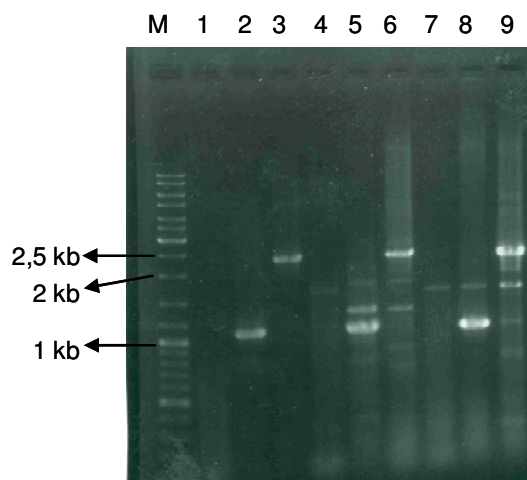


Abb. 13: Amplifikate der PCRs zum Nachweis der Vektoren SOATF3 und pcDNA3 in den transfizierten MCF7 und T47D-Zelllinien. **M:** Gene Ruler® DNA Lader Mix, **1:** Wasserkontrolle, **2:** Positiv-Kontrolle Plasmid-DNA pcDNA3, **3:** Positiv-Kontrolle Plasmid-DNA SOATF3, **4:** Negativ-Kontrolle genomische DNA von MCF7-Wildtyp, **5:** Genomische DNA MCF7pc3 Sammelklon, **6:** Genomische DNA MCF7sf3 Sammelklon, **7:** Negativ-Kontrolle genomische DNA vonT47D Wildtyp, **8:** Genomische DNA T47Dpc3 Sammelklon, **9:** Genomische DNA T47Ds3 Sammelklon.

### 5.3.2. Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Um die Transkription der SOAT-Expressionskonstrukte nachzuweisen wurde mit SOAT spezifischen Oligonukleotiden eine RT-PCR durchgeführt. Nach Präparation der m-RNA von SOAT transfizierten und den entsprechenden Wildtyp-Zelllinien MCF7 und T47D wurden diese mit Oligo (dT)<sub>18</sub>-Primern, die an den Poly-A-Schwanz der eukaryontischen RNA bindet, in cDNA umgeschrieben. Diese dient als Template in der folgenden PCR. Als Negativkontrolle diente die mRNA-Präparation ohne RT-Reaktion. Anschließend wurden die Proben auf einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde ein Fragment von 306 Bp erwartet. Die Ergebnisse werden in der Abbildung 14 und 15 dargestellt. Das 306 Bp-Amplifikat fand sich in den Ansätzen der Klone T47Ds3f3 Sammelklon (Abb. 14), MCF7sf3 Sammelklon, MCF7sf3 Einzelklon3 und 4 (Abb. 15).

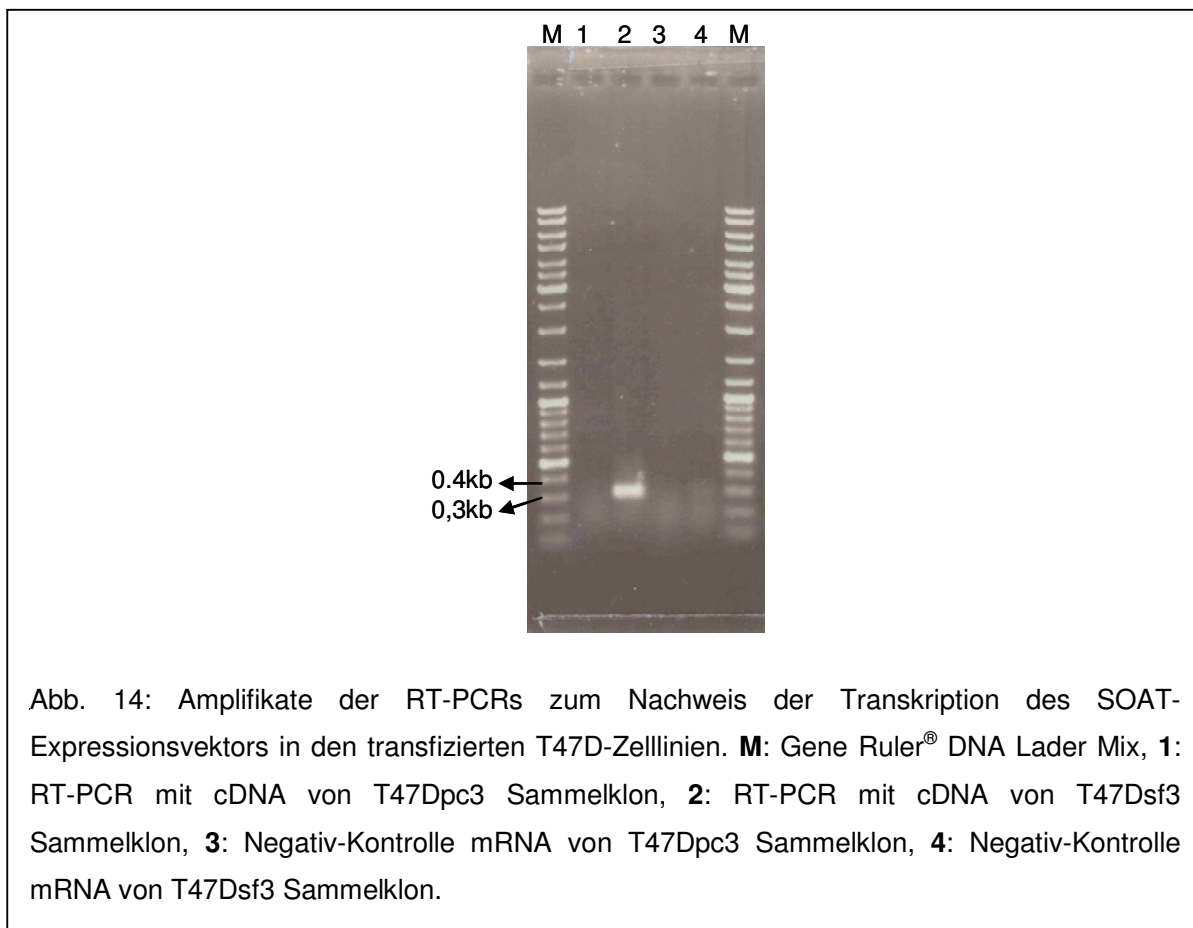


Abb. 14: Amplifikate der RT-PCRs zum Nachweis der Transkription des SOAT-Expressionsvektors in den transfizierten T47D-Zelllinien. **M**: Gene Ruler<sup>®</sup> DNA Lader Mix, **1**: RT-PCR mit cDNA von T47Dpc3 Sammelklon, **2**: RT-PCR mit cDNA von T47Ds3f3 Sammelklon, **3**: Negativ-Kontrolle mRNA von T47Dpc3 Sammelklon, **4**: Negativ-Kontrolle mRNA von T47Ds3f3 Sammelklon.



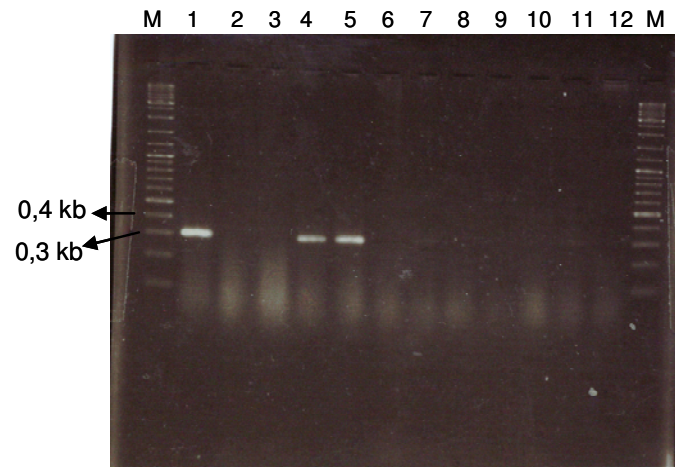


Abb. 15: Amplifikate der RT-PCRs zum Nachweis der der Transkription des SOAT-Expressionsvektors in den transfizierten MCF7-Zelllinien. **M**: Gene Ruler® DNA Lader Mix, **1**: cDNA von MCF7sf3 Sammelklon, **2**: MCF7sf3 Einzelklon1, **3**: MCF7sf3 Einzelklon2, **4**: MCF7sf3 Einzelklon3, **5**: MCF7sf3 Einzelklon4, **6**: Negativ-Kontrolle cDNA von MCF7pc3 Sammelklon, **7**: Negativ-Kontrolle mRNA von MCF7sf3 Sammelklon1, **8-11**: Negativ-Kontrolle mRNA von MCF7sf3 Einzelklon1-4, **12**: Negativ-Kontrolle mRNA von MCF7pc3 Sammelklon.

### 5.3.3 Quantitative Analyse der SOAT mRNA-Expression

Um die Expression zu quantifizieren wurde eine quantitative real time PCR mit den gewonnenen Zelllinien durchgeführt. Zusätzlich wurde das Expressionsniveau anderer Gene, die an der Estrogen-Wirkung des E<sub>1</sub>S beteiligt sind, untersucht. Die Expressionsvektor-vermittelte Überexpression des SOAT wurde so über eine weitere Methode validiert. Dazu wurden mRNA Proben aus T47Dpc3 Sammelklon, T47Dsf3 Einzelklon und T47Dsf3 Sammelklon in cDNA umgeschrieben und einer quantitativen "real time" RT-PCR unterzogen. Desweiteren wurden die Expressionsniveaus der Steroidsulfatase (STS) und der ER- $\alpha$  und - $\beta$  untersucht. Als Kontrolle diente die Linie T47Dpc3 Sammelklon. Die Ergebnisse zeigt Abb. 16.

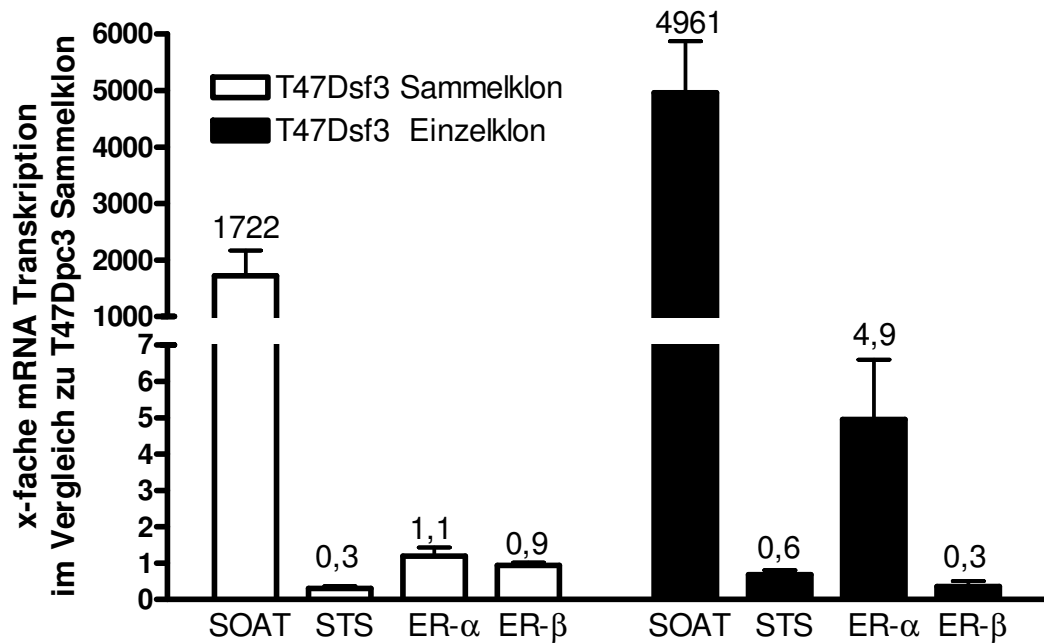


Abbildung 16: Quantitative "real time" RT-PCR-Analyse der mit SOAT transfizierte T47D-Zellen. Die Normalisierung des cDNA-Gehalts der verschiedenen Proben wurde anhand der "real time"-Daten für  $\beta$ -Aktin (ACTB) durchgeführt. SOAT: Sodium-dependent Organic Anion transporter, STS: Steroid Sulfatase, ER- $\alpha$ : Estrogenrezeptor- $\alpha$ , ER- $\beta$ : Estrogenrezeptor- $\beta$ . Als Kalibrator der relativen Quantifizierung dienten Leervektor (T47Dpcs Sammelklon) transfizierte Kontrollzellen. Die x-fache Expression wurde über eine  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Transformation berechnet.

## 5.4 Transportassay

### 5.4.1 Steroidsulfat-Aufnahme in SOAT transfizierten MCF7 und T47D Zellen

Zum Beweis der Aktivität des transfizierten Transporters wurden Aufnahmemessungen unter 25, 50, 100 und 200 nM der radioaktiv markierten SOAT-Substrate [ $^3\text{H}$ ]E<sub>1</sub>S und [ $^3\text{H}$ ]DHEAS über 10 min durchgeführt. Wie bei den bekannten Mitgliedern der SLC10-Familie NTCP und ASBT ist die Transportaktivität des SOAT abhängig von einem Na<sup>+</sup>-Gradienten über die Zellmembran. Durch die Messung des E<sub>1</sub>S- und DHEAS-Transports in An- und Abwesenheit von Na<sup>+</sup> im Medium in SOAT-transfizierten Zellen und den entsprechenden Kontrollen kann die SOAT-Aktivität gezeigt werden.

Für die Zelllinie T47Ds3 Sammelklon ließ sich eine natriumabhängige Aufnahme von E<sub>1</sub>S unter 100 und 200 nM E<sub>1</sub>S gegenüber der Kontrolle (T47Dpc3 Sammelklon) zeigen. Diese Aufnahme war statistisch signifikant (Tab. 26). Bemerkenswert ist, dass auch die Kontrollzellen eine natriumabhängige [ $^3\text{H}$ ]E<sub>1</sub>S-Aufnahme zeigten, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß. Für die Linie MCF7sf3 Sammelklon war keine natriumabhängige E<sub>1</sub>S-Aufnahme gegenüber der Kontrolle feststellbar. Für DHEAS war in keiner der SOAT-transfizierten Zelllinien eine signifikante natriumabhängige Aufnahme gegenüber der Kontrolle feststellbar (Abb. 17).

[ $^3\text{H}$ ]E<sub>1</sub>S Aufnahmemessungen in den Einzelklon T47Ds3 Einzelklon zeigten eine signifikante natriumabhängige Aufnahme in die Zellen bei einer Substratkonzentration von 10 und 100 nM über 30 min und bei 100 nM ebenso über 60 min (Abb. 18). Die p-Werte zeigt Tabelle 27.

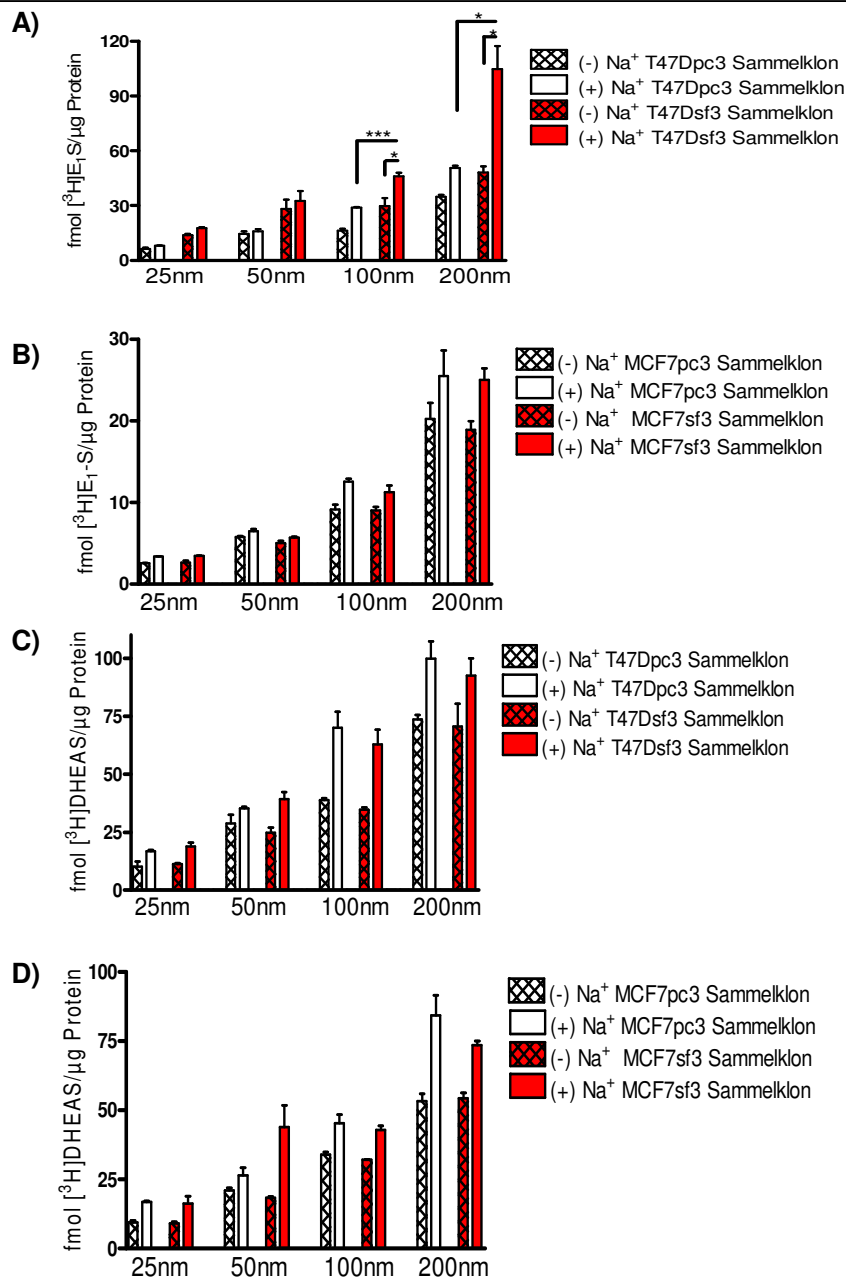


Abbildung 17: Aufnahme von  $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$  und  $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$  in die SOATF3- und pcDNA3-transfizierte Mammatumorzelllinien T47D und MCF7. Die Aufnahmemessung erfolgte über 10 min in Medien mit 142,9 mM  $\text{Na}^+$  ( $+\text{Na}^+$ ) und in  $\text{Na}^+$ -freiem Medium ( $-\text{Na}^+$  equimolare Substitution mit Cholin). **A)**  $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ -Aufnahme bei 25-200 nM in T47Dpc3 Sammelklon und T47Dsf3 Sammelklon, **B)**  $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ -Aufnahme bei 25-200 nM in MCF7pc3 Sammelklon und MCF7sf3 Sammelklon, **C)**  $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$ -Aufnahme bei 25-200 nM in T47Dpc3 Sammelklon und T47Dsf3 Sammelklon, **D)**  $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$ -Aufnahme bei 25-200 nM in MCF7pc3 Sammelklon und MCF7sf3 Sammelklon.

Tab. 26: p-Werte für die [ $^3\text{H}$ ]E $_1$ S-Aufnahme in den Linien T47Dsf3 Sammelklon gegenüber T47Dpc3 (**A**) Sammelklon, bzw. gegenüber der natriumfreien Kontrolle (**B**) bei einer Substratkonzentration von 100 und 200 nM.

**A)****T47Dsf3 Sammelklon gegenüber T47Dpc3****Sammelklon (in Anwesenheit von Na $^+$ )****p-Wert**

100nM [ $^3\text{H}$ ]E $_1$ S	0.0009
200nM [ $^3\text{H}$ ]E $_1$ S	0.012

**B)****T47Dsf3 Sammelklon bei 142,9 mM Na $^+$  gegenüber****natriumfreiem Medium****p-Wert**

100nM [ $^3\text{H}$ ]E $_1$ S	0.026
200nM [ $^3\text{H}$ ]E $_1$ S	0.012

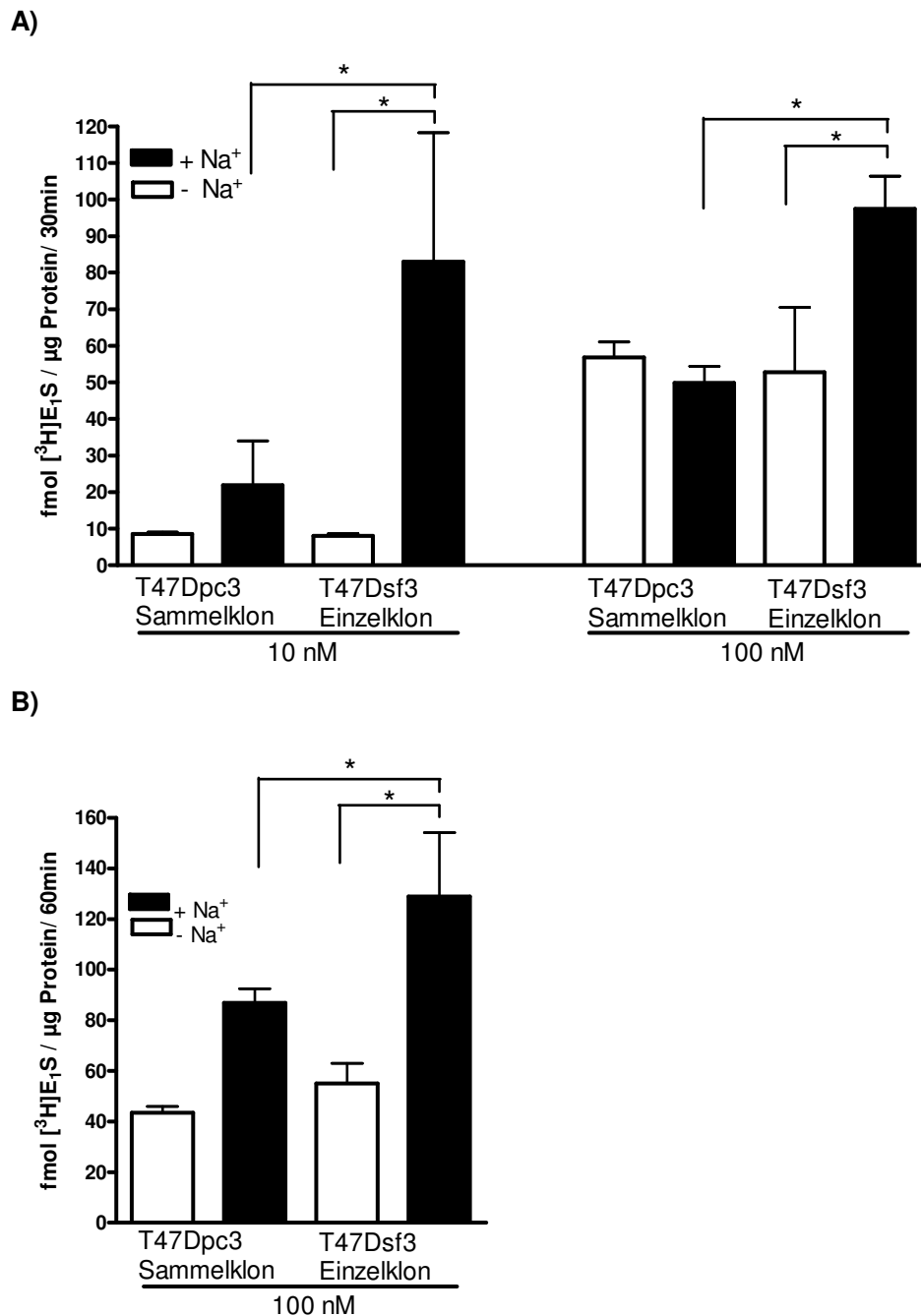


Abb. 18: Aufnahme von  $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$  in die SOATF3- und pcDNA3-transfizierte Mammatumorzelllinien T47Dpc3 Sammelklon und T47Dsf3 Einzelklon. Die Aufnahmemessung erfolgte über 30 oder 60 min in Medien mit 142,9 mM  $\text{Na}^+$  ( $+\text{Na}^+$ ) und in  $\text{Na}^+$ -freiem Medium ( $-\text{Na}^+$ ). **A)**  $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ -Aufnahme bei 10 und 100nM über 30 min in T47Dpc3 Sammelklon und T47Dsf3.4, **B)**  $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ -Aufnahme bei 100nM über 60 min in T47Dpc3 Sammelklon und T47Dsf3 Einzelklon. \* signifikanter Unterschied.

Tab. 27: p-Werte für die [ $^3\text{H}$ ]E<sub>1</sub>S-Aufnahme in T47Dsf3 Einzelklon gegenüber T47Dpc3 Sammelklon (**A**), bzw. gegenüber der natriumfreien Kontrolle (**B**) bei einer Substratkonzentration von 10 und 100 nM.

**A)**

**T47Dsf3 Einzelklon gegenüber T47Dpc3 Sammelklon**  
**(in Anwesenheit von Na<sup>+</sup>)**

	p-Wert
10 nM [ $^3\text{H}$ ]E <sub>1</sub> S	0.047
100 nM [ $^3\text{H}$ ]E <sub>1</sub> S	0.0012

**B)**

**T47Dsf3 Einzelklon bei 142,9 mM Na<sup>+</sup> gegenüber**  
**natriumfreiem Medium**

	p-Wert
10 nM [ $^3\text{H}$ ]E <sub>1</sub> S	0.0071
100 nM [ $^3\text{H}$ ]E <sub>1</sub> S	0.0176

Es wurden zusätzlich [ $^3\text{H}$ ]E $_1$ S-Aufnahmemessungen an den T47Dsf3 Einzelklon-Zellen in Zeitabhängigkeit durchgeführt. Hierbei ließ sich jedoch keine klassische Sättigungskinetik zeigen (Abb. 19).

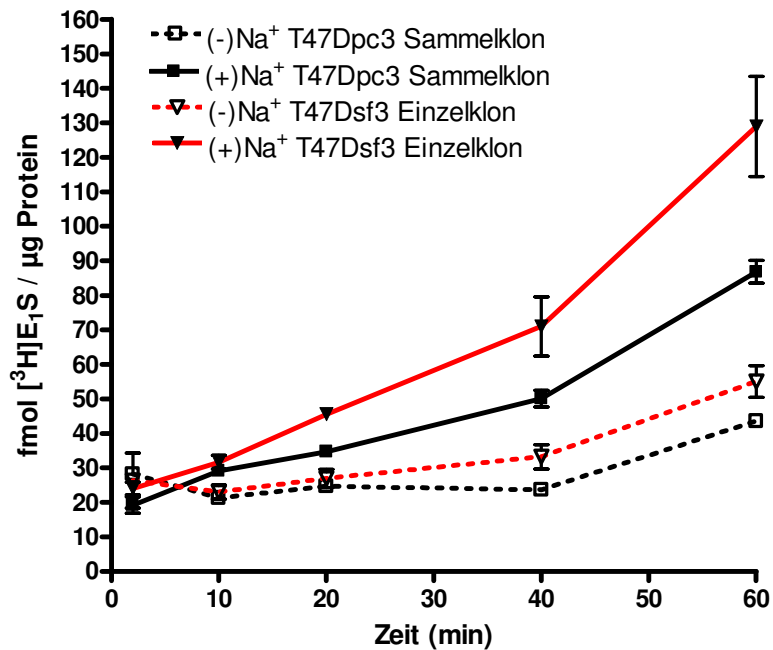


Abbildung 19: Zeitabhängige Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]E $_1$ S in Zellen der Linien T47Dsf3 Einzelklon und T47Dpc Sammelklon: Die zeitabhängige Aufnahmemessung erfolgte über 60 min in Medien mit 142,9 mM Na<sup>+</sup> (+Na<sup>+</sup>) und in Na<sup>+</sup>-freiem Medium (-Na<sup>+</sup>) bei einer [ $^3\text{H}$ ]E $_1$ S-Konzentration von 100 nM.



## 5.5 Etablierung des Proliferationsassays: Bestimmung der optimalen Bedingungen

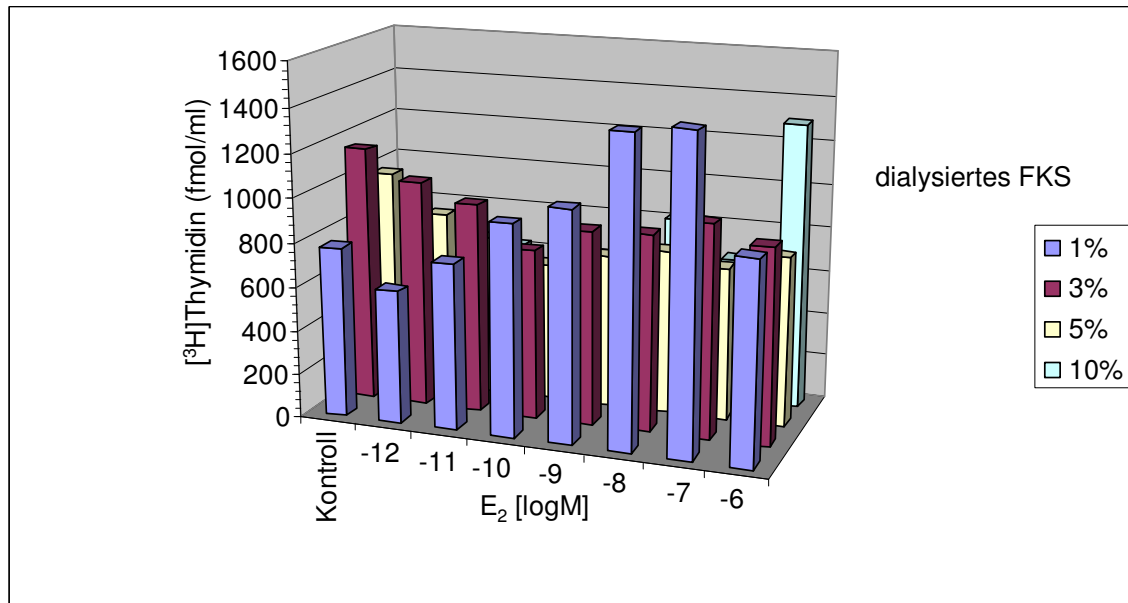
Um den Einfluss der SOAT-Expression oder des knock downs auf eine Proliferation der Zelllinien unter Anwesenheit der sulfatierten Steroide E<sub>1</sub>S und DHEAS zu messen, sollten die Zellen in Estrogen-freiem Medium mit verschiedenen Konzentrationen der Steroidsulfate kultiviert werden. Die Proliferation wurde durch den Einbau von [<sup>3</sup>H]Thymidin bei der DNA-Replikation quantifiziert.

Da die Estrogenquelle in Zellkulturmedium das FKS darstellt, musste estrogenfreies FKS eingesetzt werden. Dieses konnte entweder kommerziell als dialysiertes Medium bezogen werden oder als herkömmliches FKS durch Behandlung mit Dextran-Charcoal (DCC) von dem Estrogen befreit werden. Beide Alternativen wurden bei FKS-Konzentrationen von 1, 3, 5, 10 % überprüft. Darüber hinaus musste die maximale Proliferation als Positivkontrolle ermittelt werden. Hierfür wurde Estradiol in einem Konzentrationsbereich von 10<sup>-12</sup>-10<sup>-6</sup> M den Medien zugefügt. Als Negativ-Kontrolle wurden die Zellen mit Estrogen-freiem Medium kultiviert.

Aus diesen zwei Fragestellungen (FKS- und Estrogengehalt) ergab sich ein zweidimensionaler Versuchsaufbau, durch den die optimalen Bedingungen zur Messung einer Estradiol-abhängigen Proliferation bestimmt werden konnten. Diese Vorversuche wurden mit dem T47Dpc3 Sammelklon durchgeführt.

Die Zellen wurden vor der Kultivierung in den unterschiedlichen Medien in Estrogen-freiem Medium für vier Tage von Estrogenen befreit und dann im 24-Well-Format mit einer Probenanzahl (n) von 4 plattiert und nach Adhäsion mit dem Testmaterial versetzt. Vor Erreichen der Konfluenz nach 7 Tagen wurden sie mit einem µCi [<sup>3</sup>H]Thymidin mit einer spezifischen Aktivität von 86 Ci/mmol über 2 h inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

A)



B)

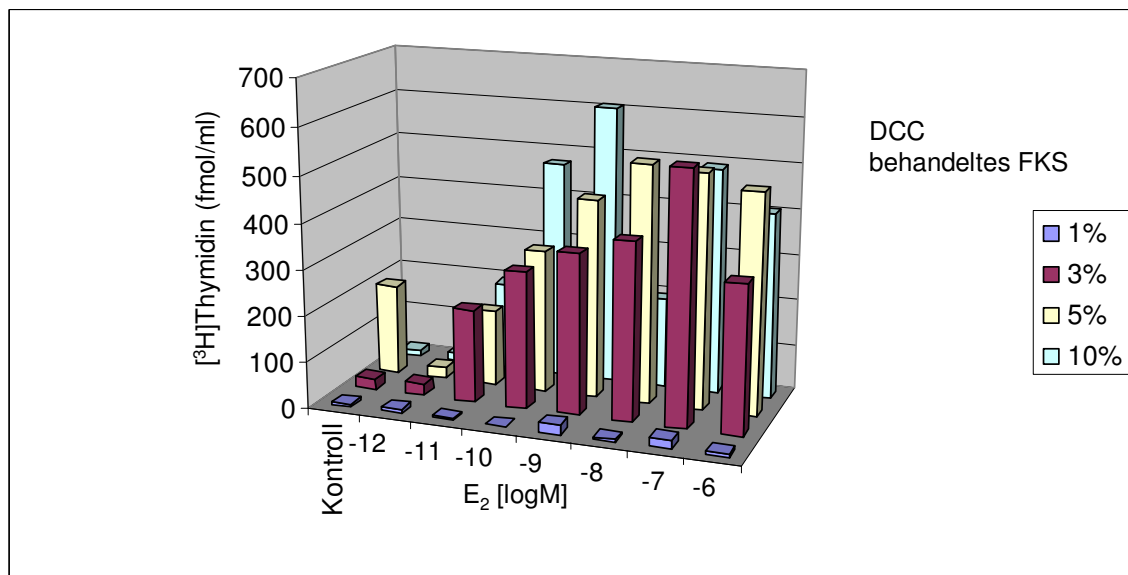


Abb. 20:  $[^3\text{H}]\text{Thymidin}$ -Inkorporation von T47Dpc3 Sammelklon-Zellen nach Kultur in Medium, das dialysiertes (A) oder Dextran Charcoal-behandeltes (DCC) FKS (B) und Estradiol in unterschiedlichen Konzentrationen enthielt.

Es stellte sich heraus, dass die stabilsten Ergebnisse bei einem Gehalt von 5 % DCC-behandeltem FKS zu erreichen waren. Diese DCC-FKS-Konzentration wurde bei den folgenden Versuchen eingesetzt.

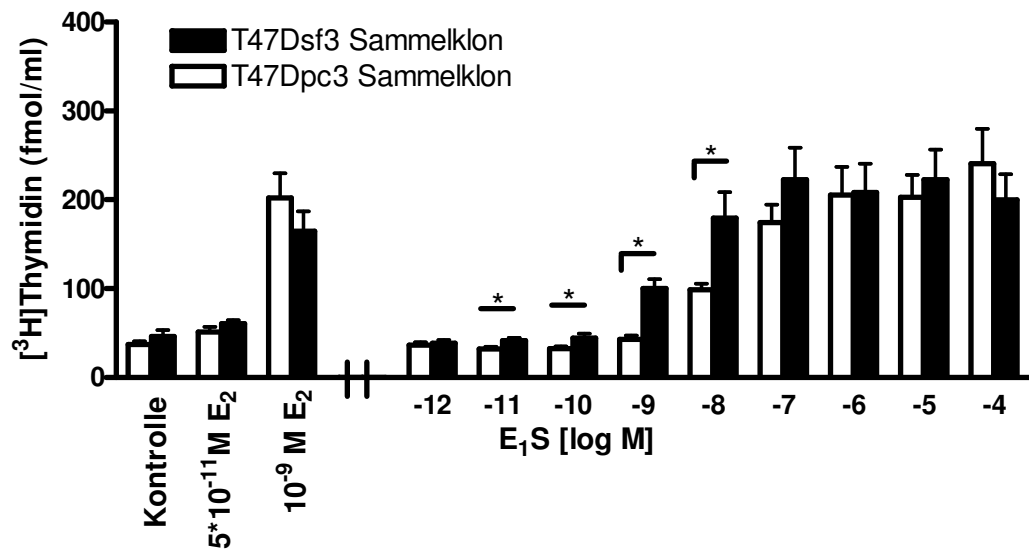
Die maximale Proliferation wurde unter  $10^{-9}$  M Estradiol gemessen. Dieser Wert liegt über der in der Literatur üblichen  $5 \times 10^{-11}$  M. In den folgenden Versuchen wurden daher als Positivkontrolle  $10^{-9}$  und  $5 \times 10^{-11}$  M Estradiol eingesetzt.

### **5.5.1 Bestimmung des Proliferationsverhaltens der Zelllinien unter Steroidsulfaten**

Zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens der SOAT-transfizierten und knock down- Zellen wurden diese unter  $E_1S$ - und DHEAS-Konzentrationen von  $10^{-4}$  bis  $10^{-12}$  M kultiviert.

Untersucht wurden die Zelllinien T47Dpc3 Sammelklon, T47Dsf3 Sammelklon, MCF7pc3 Sammelklon, MCF7sf3 Sammelklon, sowie die Linien T47Dsk Sammelklon, T47Dsi Sammelklon1, MCF7sk Sammelklon und MCF7si Sammelklon2. Da die MCF7-Zelllinien ein schnelleres Wachstum zeigen wurden sie nur über 4 Tage kultiviert. Die Ergebnisse zeigen die Abbildungen 21-25.

A)



B)

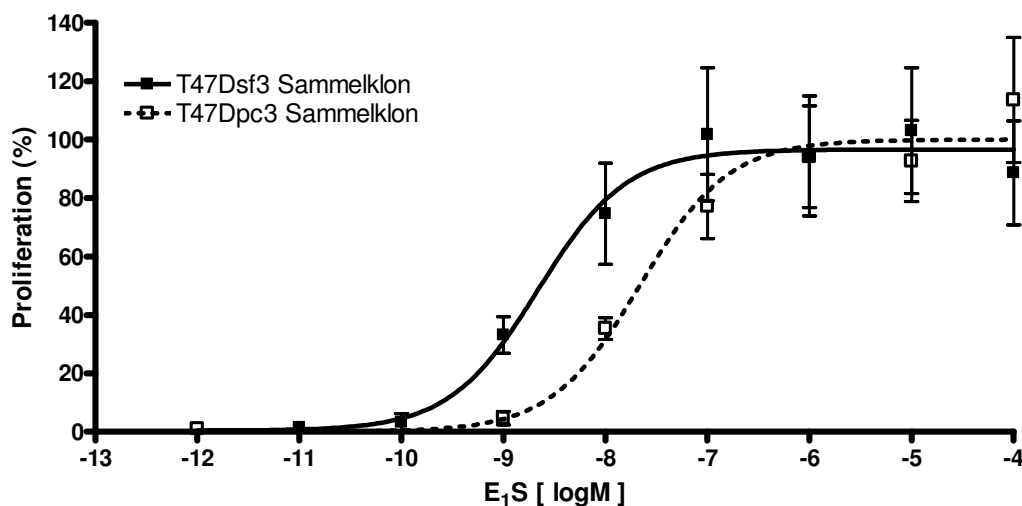


Abb. 21: **A)** [<sup>3</sup>H]Thymidin-Inkorporation der Zelllinien T47Dsf3 Sammelklon und T47pc3 Sammelklon nach Kultur über 7 Tage unter steigenden Konzentrationen E<sub>1</sub>S bezogen auf 1 ml Lysat. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von drei Versuchen mit jeweils n=4. **B)** Die selben Daten in sigmoidaler Darstellung. Die EC<sub>50</sub> für E<sub>1</sub>S bei T47Dsf3 Sammelklon beträgt 2,2 ± 0,3 nM und für die Kontrollzellen T47Dpc3 Sammelklon 21,7 ± 2,1 nM. Dies entspricht einer etwa 10fach höheren Sensitivität der SOAT-transfizierten Zellen auf E<sub>1</sub>S gegenüber der Kontrolle. \* signifikanter Unterschied.

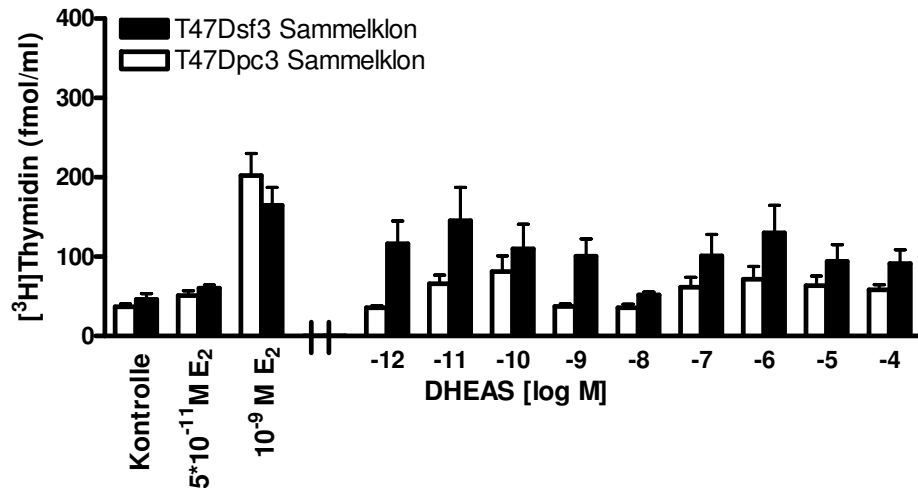
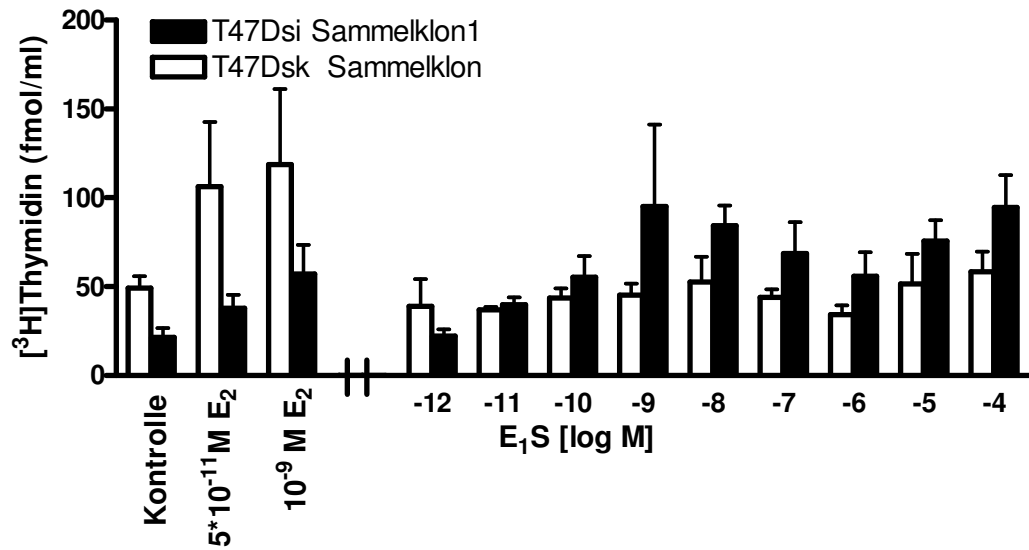


Abb. 22: [<sup>3</sup>H]Thymidin-Inkorporation der Zelllinien T47Dsf3 Sammelklon und T47pc3 Sammelklon nach Kultur über 7 Tage unter unterschiedlichen Konzentrationen von DHEAS bezogen auf 1 ml Lysat. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von drei Versuchen mit jeweils n=4.

A)



B)

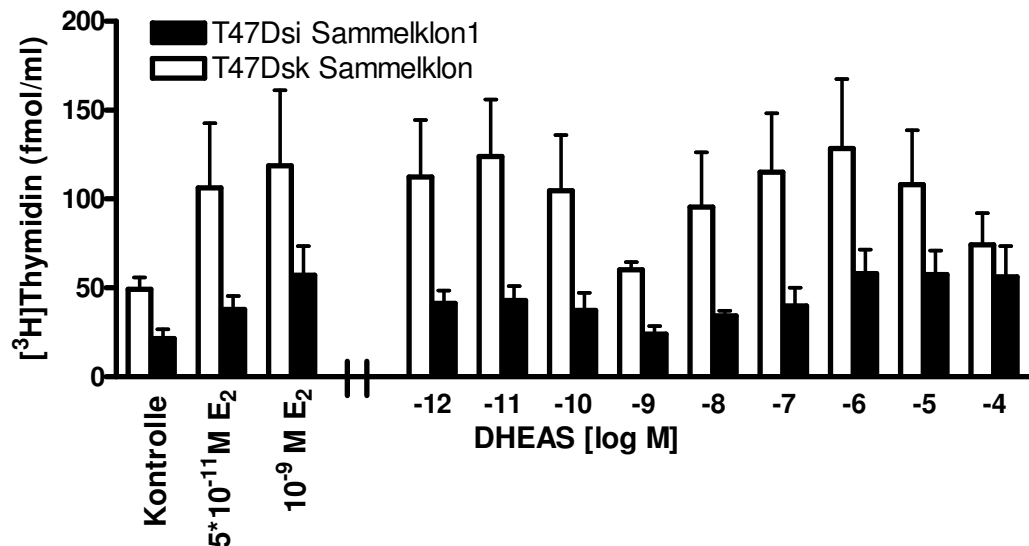
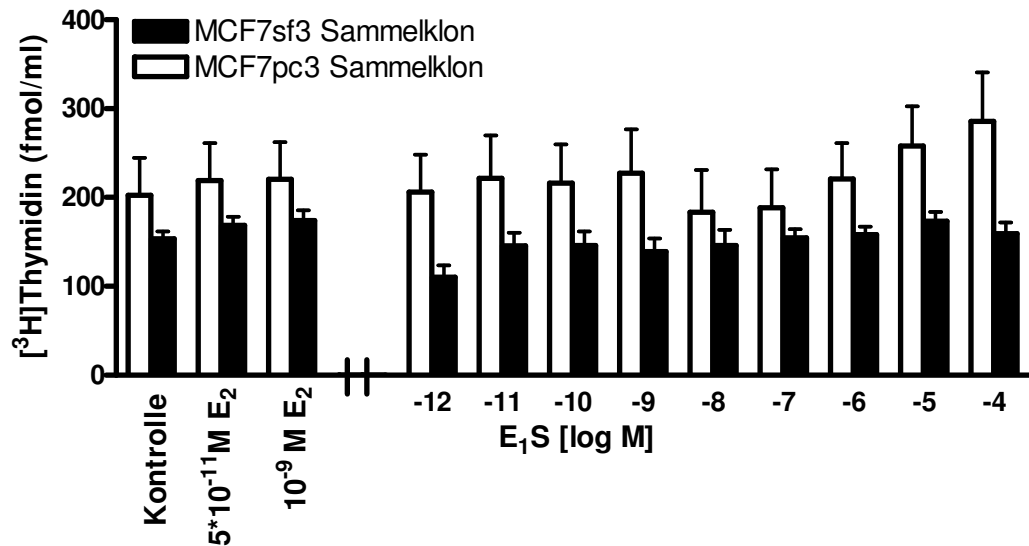


Abb. 23: [<sup>3</sup>H]Thymidin-Inkorporation der Zelllinien T47Dsi Sammelklon1 und T47sk Sammelklon nach Kultur über 7 Tage unter unterschiedlichen Konzentrationen von E<sub>1</sub>S (A) und DHEAS (B) bezogen auf 1 ml Lysat. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von drei Versuchen mit jeweils n=4. T47Dsk Sammelklon: siRNA-Kontrolle, T47Dsi Sammelklon1: Anti-SOAT siRNA-transfizierte Zellen

A)



B)

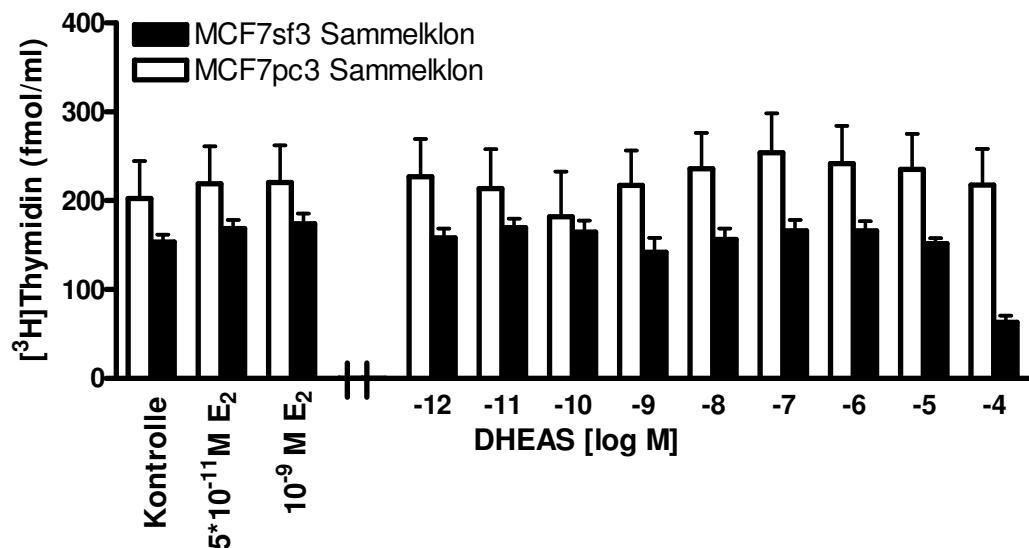
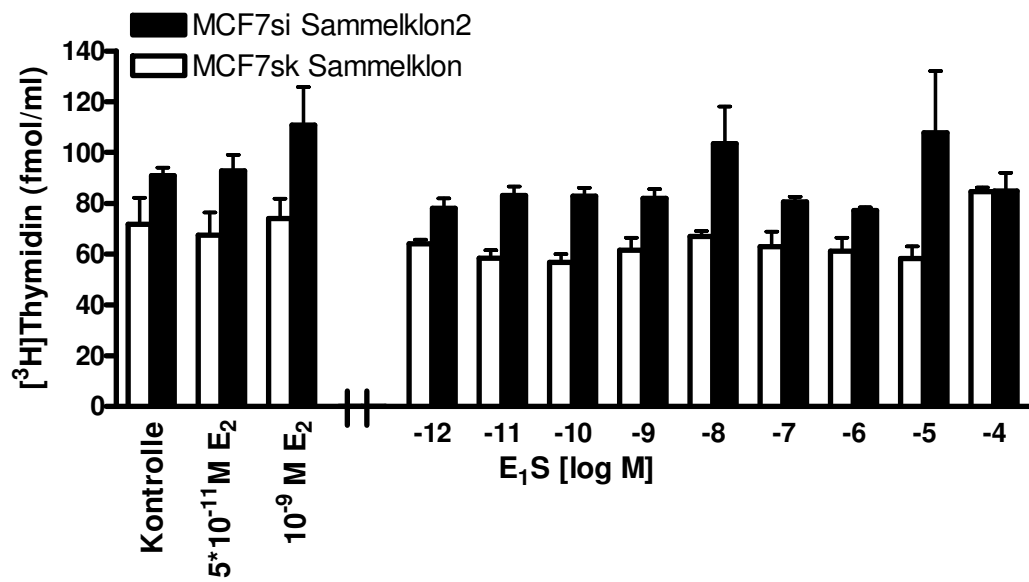


Abb. 24: [<sup>3</sup>H]Thymidin-Inkorporation der Zelllinien MCF7sf3 Sammelklon und MCF7pc3 Sammelklon nach Kultur über 7 Tage unter unterschiedlichen Konzentrationen E<sub>1</sub>S (A) und DHEAS (B) bezogen auf 1 ml Lysat. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von drei Versuchen mit jeweils n=4.

A)



B)

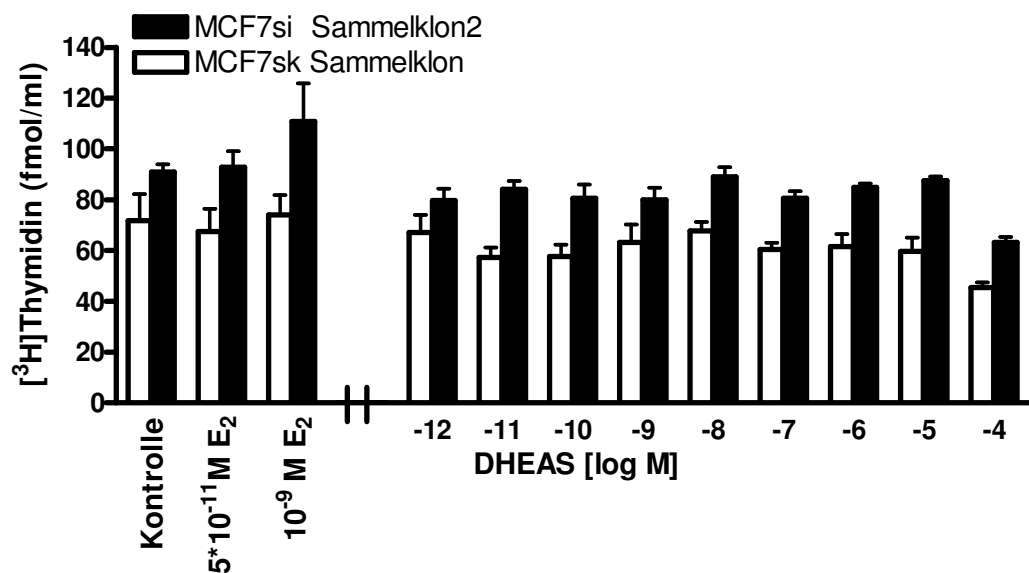


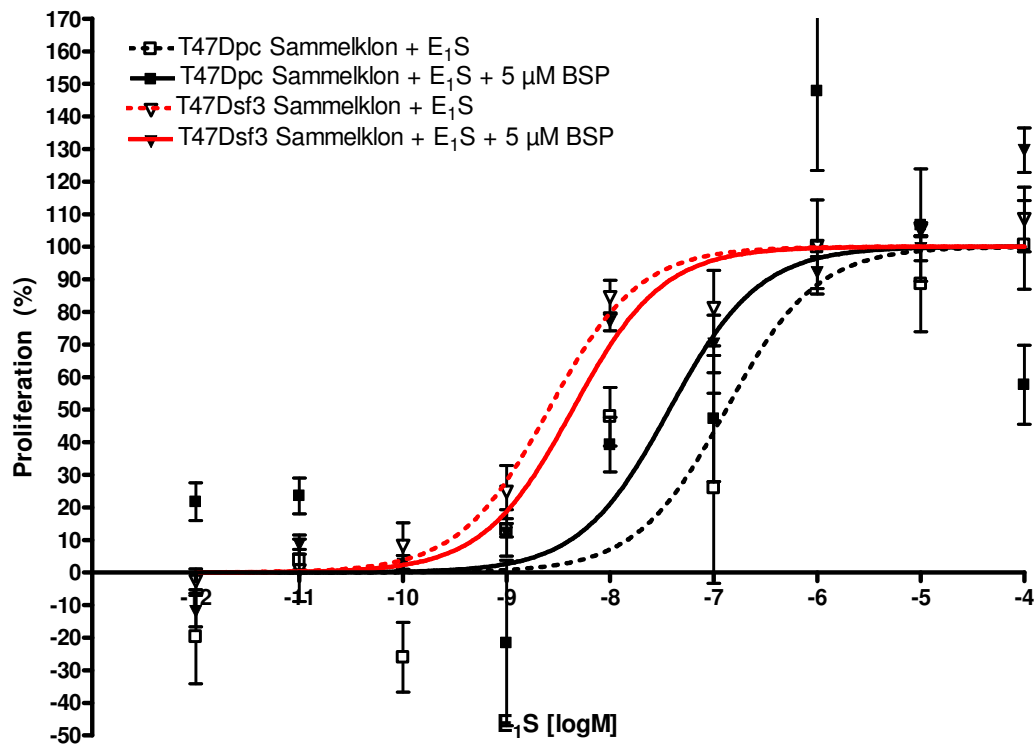
Abb. 25: [<sup>3</sup>H]Thymidin-Inkorporation der Zelllinien MCF7si Sammelklon2 und MCF7sk Sammelklon nach Kultur über 7 Tage unter unterschiedlichen Konzentrationen von E<sub>1</sub>S (A) und DHEAS (B) bezogen auf 1 ml Lysat. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von drei Versuchen mit jeweils n=4.



### **5.5.2 Hemmung des SOAT-vermittelten Proliferationssteigerung bei transfizierten Zellen**

Da die Proliferationsuntersuchungen an den siRNA-transfizierten MCF7 und T47D und SOAT tranfizierten MCF7 keine interpretierbaren Ergebnisse lieferten, wurden die folgenden Untersuchungen nur mit den SOAT-transfizierten T47D-Zellen (T47Ds3 Sammelklon) und der Linie T47Dpc3 Sammelklon als Kontrolle durchgeführt. Um den bei diesen Zellen beobachteten Effekt der SOAT-Expression auf die  $E_1S$ -Sensitivität eindeutig der SOAT-Aktivität zuordnen zu können wurden Proliferations-Hemmversuche mit bekannten SOAT-Inhibitoren durchgeführt. Der Versuchsaufbau entsprach den Proliferationsmessungen. Die Hemmversuche mit BSP (5  $\mu$ M) und  $\alpha$ -Naphtyl-Sulfat (10  $\mu$ M) wurden  $E_1S$ -Konzentrationsabhängig, analog zu den ungehemmten Proliferationsversuchen durchgeführt. Ihre Ergebnisse in sigmoidaler Darstellung zeigen Abb. 26-A und -B. Durch diese Substanzen ließ sich keine signifikante Hemmung zeigen.

A)



B)

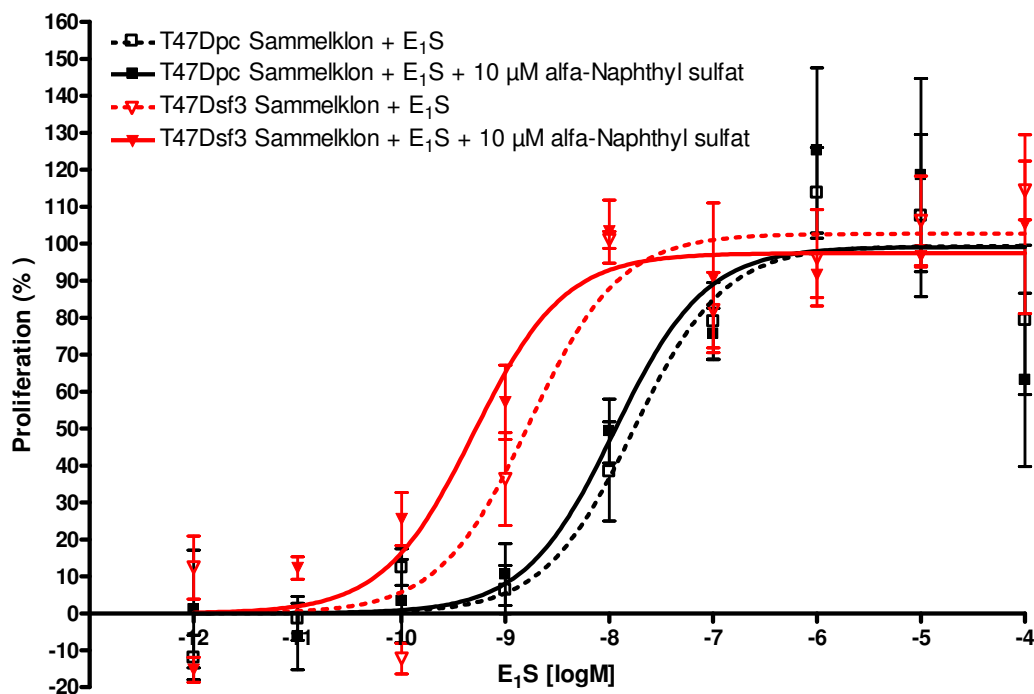
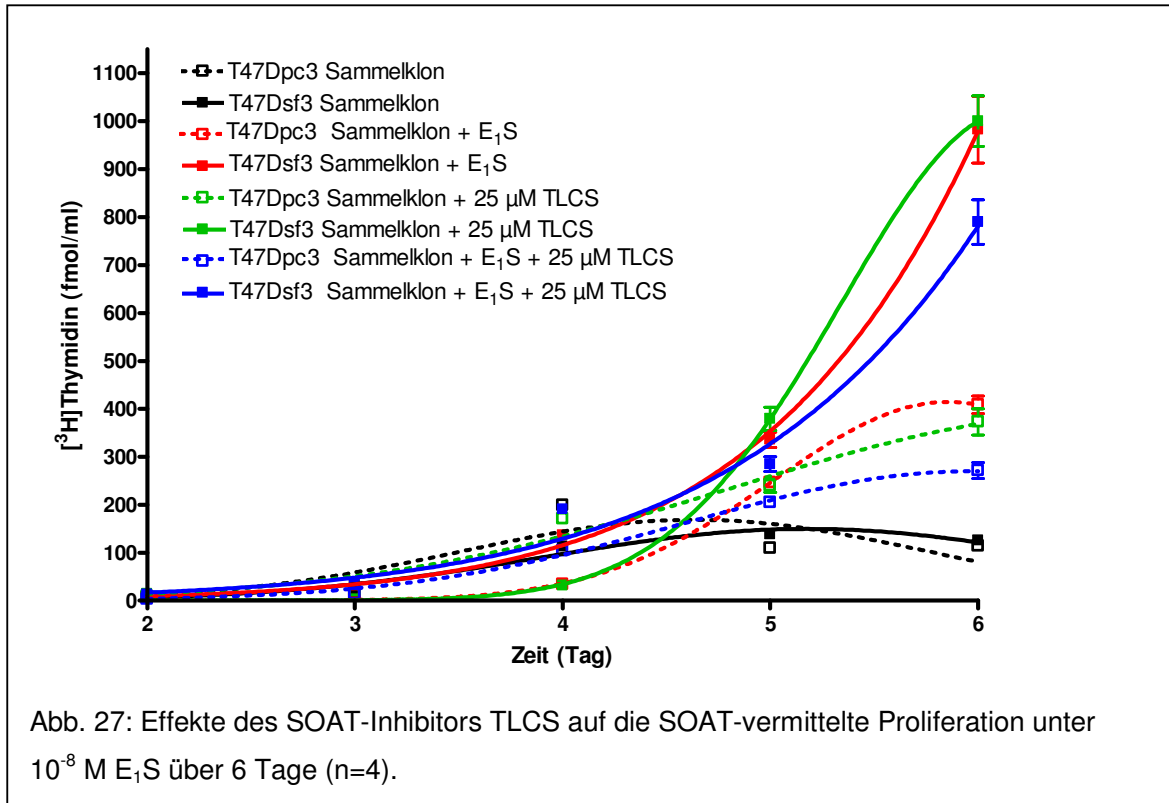


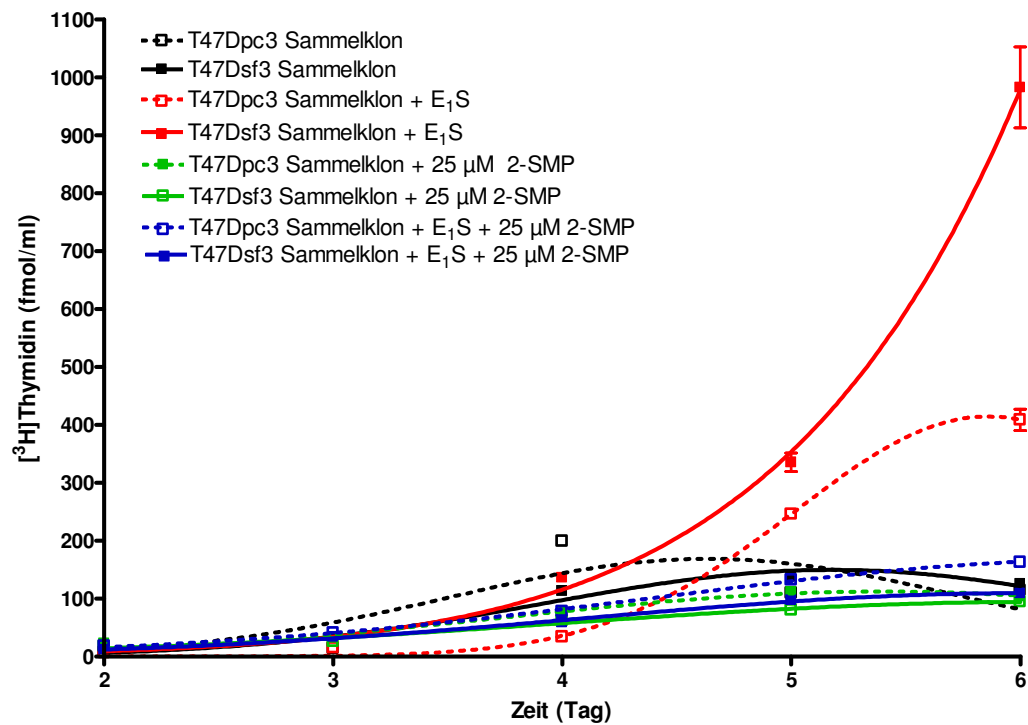
Abb. 26: Effekte der SOAT-Inhibitoren BSP (A) und  $\alpha$ -Naphthyl-Sulfat (B) auf die SOAT-vermittelte Proliferation unter  $10^{-8}$  M  $E_1S$  über 6 Tage (n=4). T47Dpc3 Sammelklon: Kontrollzellen, T47Dsf3 Sammelklon: SOAT transfizierten Zellen.

Der SOAT-Inhibitor Sulfotaurolithocholat (TLCS) wurde in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die Proliferation wurde bei  $10^{-8}$  M  $\text{E}_1\text{S}$  zeitabhängig ab dem zweiten und bis zum sechsten Tag gemessen. Abb. 27 zeigt die Ergebnisse des Versuchs. TLCS hatte keinen signifikanten Einfluss auf das  $\text{E}_1\text{S}$ -stimulierte Proliferationsverhalten des T47Dsf3 Sammelklons.



Die SOAT-Inhibitoren 2-SMP und 4-SMP, nichtsteroidale Organosulfatverbindungen, wurden in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Wie mit TLCS wurde die Hemmung über 6 Tage zeitabhängig in der Anwesenheit  $10^{-8}$  M  $\text{E}_1\text{S}$  gemessen. Die Ergebnisse (Abb. 28) zeigen dass die SOAT-abhängige Proliferation durch  $\text{E}_1\text{S}$  durch 2- und 4-SMP hemmbar ist.

A)



B)

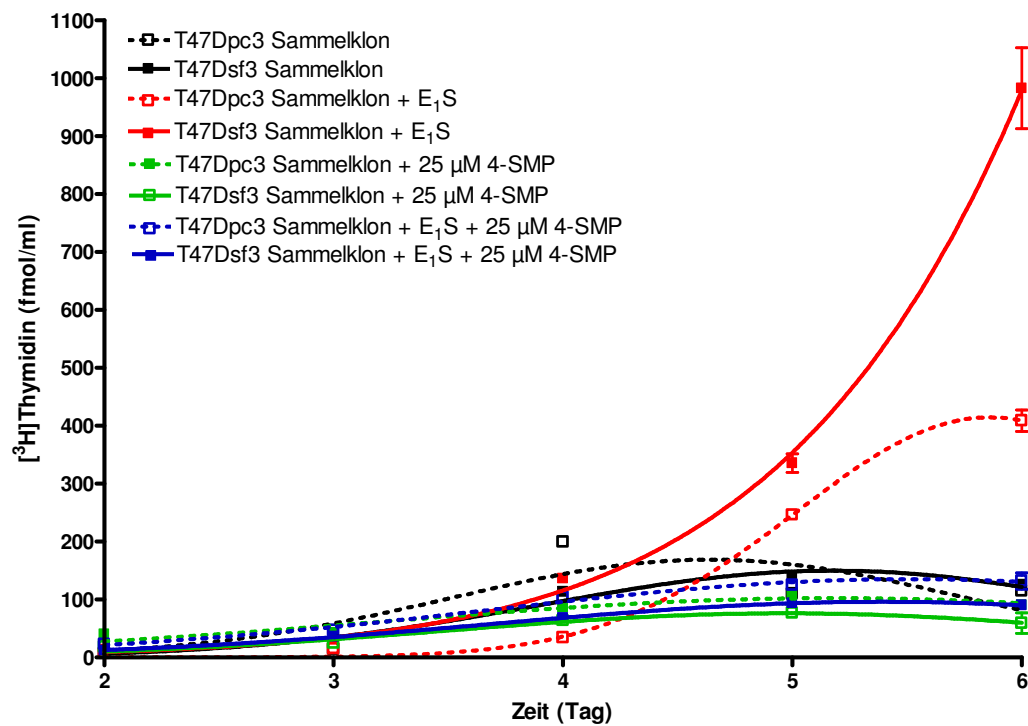
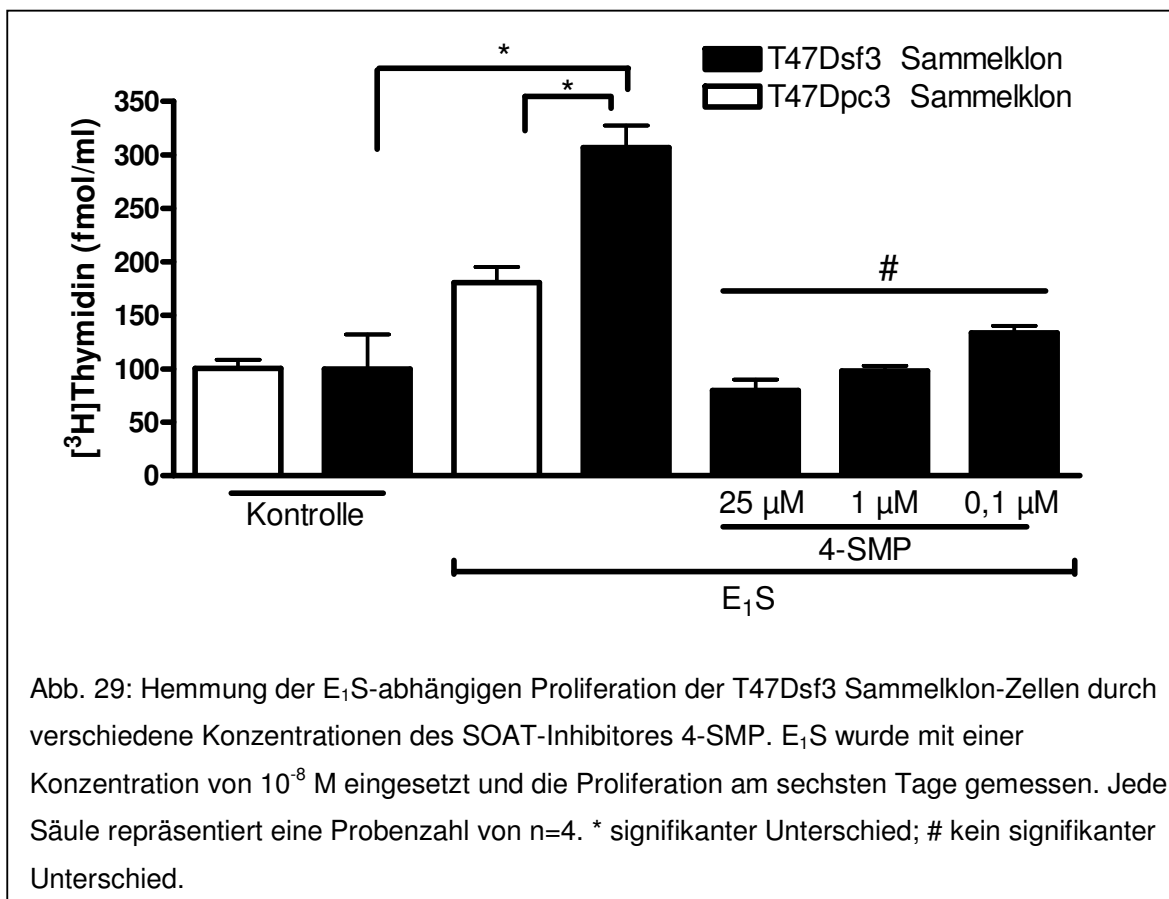
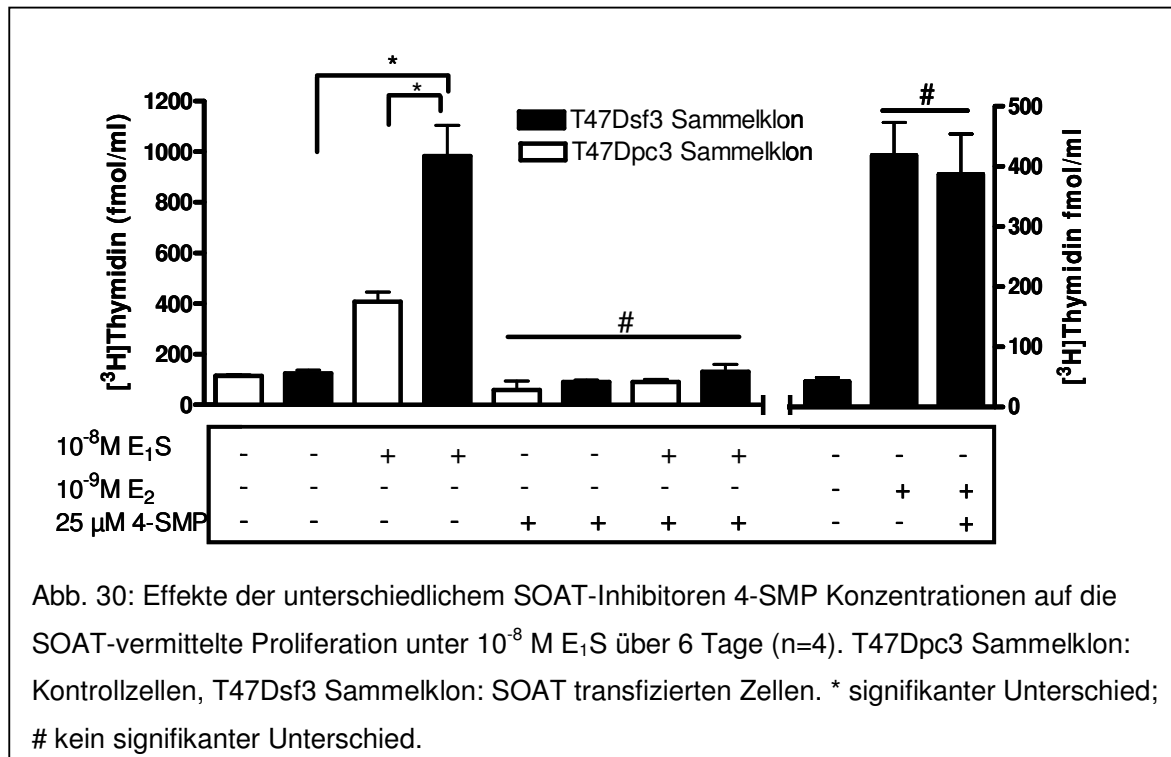


Abb. 28: Effekte der SOAT-Inhibitoren 2-SMP (A), und 4-SMP (B) auf die SOAT-vermittelte Proliferation unter  $10^{-8}$  M  $E_1S$  über 6 Tage. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von drei Versuchen mit jeweils  $n=4$ .

In einem weiteren Versuch wurde 4-SMP in den Konzentrationen 25, 1, und 0,1  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Hier wurde die Proliferation am sechsten Tag gemessen. Es zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung der  $\text{E}_1\text{S}$ -stimulierten Proliferation der T47Dsf3 Sammelklonzellen (Abb. 29).

Um andere, unspezifische toxische Effekte des 4-SMP auf die Proliferation auszuschließen wurde die Wirkung des 4-SMP auf die  $\text{E}_2$ -vermittelte, also SOAT-unabhängige, Proliferation untersucht. Zum Einsatz kamen Konzentrationen von  $10^{-8}$  M  $\text{E}_1\text{S}$ ,  $10^{-9}$  M  $\text{E}_2$  und 25  $\mu\text{M}$  4-SMP. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 30. Der Versuch zeigte, dass 4-SMP keinen Einfluss auf die  $\text{E}_2$ -vermittelte Proliferation hat.





Um zu zeigen, dass die  $E_1S$ -stimulierte Proliferation Estrogenrezeptor  $\alpha$ - und Steroid-sulfatase-abhängig ist, wurde der Versuch in Anwesenheit des Estrogenrezeptor Antagonisten Tamoxifen und des STS-Inhibitor STX64 (667 Coumate) durchgeführt. Die Proliferationsmessung erfolgte am sechsten Tag.  $E_1S$  wurde in einer Konzentration von  $10^{-8}$  M eingesetzt, Tamoxifen und STX64 zu 5  $\mu$ M. Die SOAT-vermittelte Proliferation konnte im Proliferationsassay durch die Koapplikation des Estrogenrezeptorantagonisten Tamoxifen sowie des STS-Inhibitors STX64 (667 Coumate) unter  $E_1S$  unterdrückt werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 31 dargestellt.

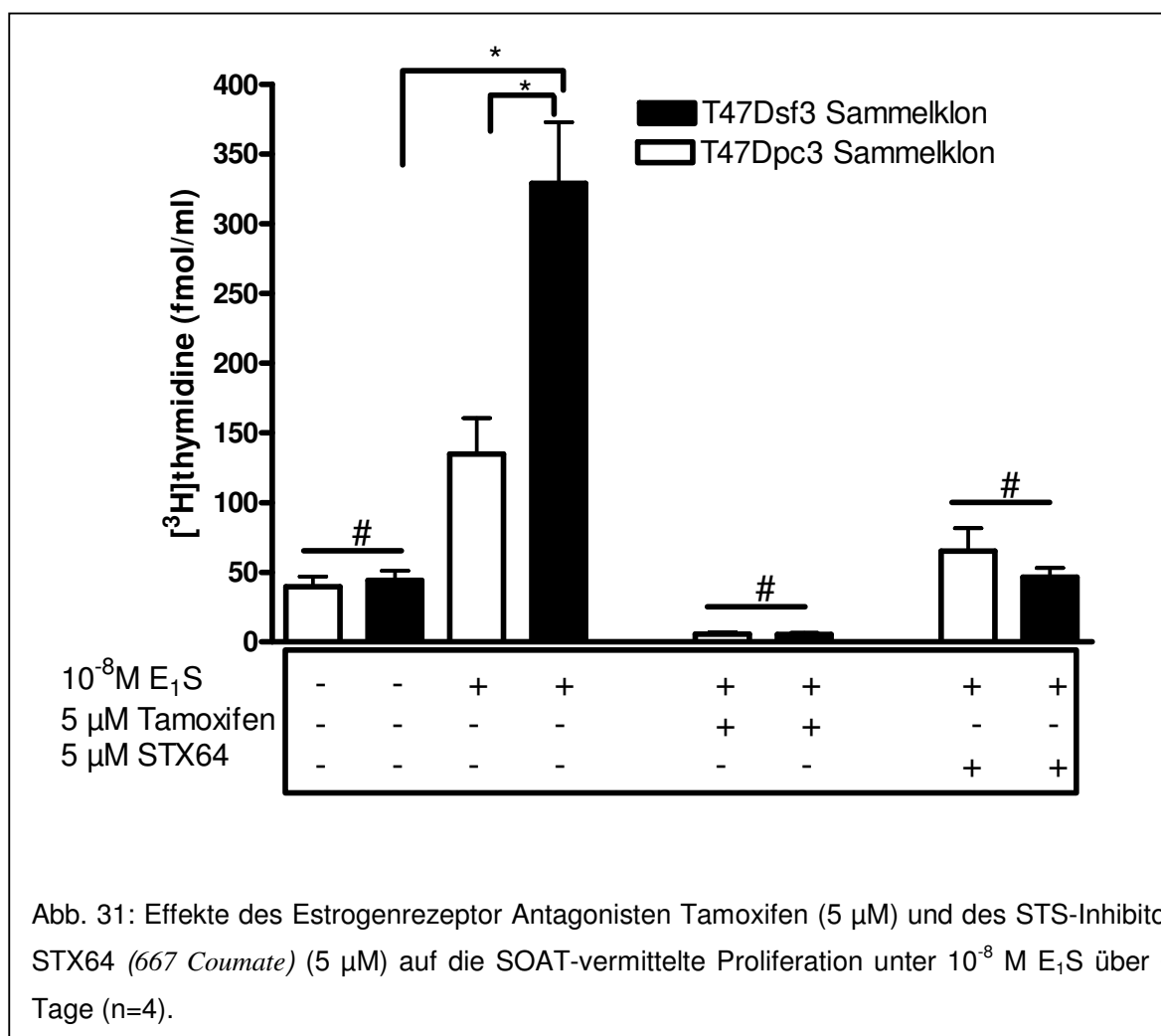


Abb. 31: Effekte des Estrogenrezeptor Antagonisten Tamoxifen ( $5\text{ }\mu\text{M}$ ) und des STS-Inhibitor STX64 (*667 Coumate*) ( $5\text{ }\mu\text{M}$ ) auf die SOAT-vermittelte Proliferation unter  $10^{-8}\text{ M E}_1\text{S}$  über 6 Tage ( $n=4$ ).

## 6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Steroidsulfat-Transporters SOAT auf die Proliferation Estrogen-abhängiger Mammatumorzelllinien unter Steroidsulfaten zu untersuchen. Bei den untersuchten Zelllinien handelte es sich um die Linien T47D (durch pleurale Effusion aus einem duktalem Karzinom gewonnen) und MCF7 (durch pleurale Effusion aus einem Adenokarzinom gewonnen).

In diesen Zelllinien konnten Geyer et al. (unpublizierte Daten) durch RT-PCR eine endogene Expression des SOAT zeigen, gleichzeitig exprimieren diese Zellen die nötigen Enzyme für eine intrakrine Estrogensynthese ausgehend von  $E_1S$  und DHEAS (Pasqualini et al. 1989; Najid und Habrioux 1990; Saeki et al. 1999; Maggiolini et al. 2001).

Die funktionellen Auswirkungen dieses Expressionsprofils konnten in Form des Nachweises estrogener Metaboliten von extrazellulär angebotenen DHEAS, bzw. einer Steroidsulfat-induzierten Proliferation gezeigt werden (Le Bail et al. 1998 und 2002).

Um den Einfluss des SOAT bestimmen zu können, wurde über den Expressionsvektor pcDNA3 eine SOAT-Expressionskassette in die Zelllinien transfiziert. Durch die Transfektion können unspezifische Effekte, u.a. durch Insertionsmutagenese, auftreten. Um diese Effekte auszuschließen, wurden von den transfizierten Zellen über Kultur unter G418 sowohl Einzelklone als auch Sammelklone selektiert. Eine stabile Integration der Expressionskassette konnte durch PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für die gesamte Expressionskassette sowie Transkription SOAT-spezifischer mRNA durch RT-PCR und quantitative RT-PCR (nur T47D-Zelllinien) in vielen Klonen beider Zelllinien nachgewiesen werden (Tab. 25). Zur Absicherung der Aktivität des transfizierten Transporters wurden Aufnahmemessungen mit den radioaktiv markierten SOAT-Substraten  $[^3H]E_1S$  und  $[^3H]DHEAS$  durchgeführt. Wie bei allen bekannten Mitgliedern der SLC10-Familie ist die Transportaktivität des SOAT abhängig von einem Natrium-Gradienten über die Zellmembran. Durch die Messung des  $E_1S$ , bzw. DHEAS-Transports in An- und Abwesenheit von Natrium im Medium in den transfizierten Zellen und den entsprechenden Kontrollen kann die SOAT-Aktivität nachgewiesen werden.

Es konnte ein Natrium-abhängiger Import von  $[^3H]E_1S$  in SOAT-transfizierten T47D-Zellen, sowohl im Einzelklon (T47Dsf3 Einzelklon, Abb. 18), als auch im Sammelklon (T47Dsf3 Sammelklon, Abb. 17-A) gezeigt werden, wobei die Aufnahme im Einzelklon höher war als im Sammelklon. Der Einzelklon zeigte in der quantitativen RT-PCR mit 4961-fach stärkerer Transkription als die Kontrolle auch eine deutlich höhere Überexpression als der Sammelklon (1722-fach der Kontrolle) (Abb. 16), so dass der Grund für den höheren  $[^3H]E_1S$ -Transport in dieser Zelllinie in dem Expressionsniveau zu liegen scheint. Transport von  $[^3H]DHEAS$  ließ sich reproduzierbar in keiner T47D-Zelllinie nachweisen (Abb. 17-C). Ebenso war auch in den



MCF7-Zelllinien kein Transport, sowohl von [ $^3\text{H}$ ]E<sub>1</sub>S (Abb. 17-B) als auch von [ $^3\text{H}$ ]DHEAS (Abb. 17-D) nachweisbar.

Aufgrund der gewonnenen Daten kann davon ausgegangen werden, dass die SOAT-Transfektion in die Zelllinien erfolgreich war. Ein funktioneller Nachweis der SOAT-Aktivität konnte zwar nur in den T47D-Zelllinien gezeigt werden, trotzdem wurden auch die SOAT-transfizierten MCF7-Zelllinien in die nachfolgenden Proliferationsassays einbezogen.

In einem parallelen Ansatz wurde versucht die SOAT-Expression durch die Anwendung der RNA-interference (RNAi) Technik zu hemmen. Hierfür wurde ein Vektor kloniert, der eine SOAT-spezifische shRNA-Kassette enthält und eine Selektion über G418 ermöglicht. Von diesen Transfektionen wurden Sammelklone isoliert. Die stabile Integration des Konstrukts wurde über PCR überprüft.

Die eigentliche Überprüfung des SOAT-Einflusses auf die Steroidsulfat-vermittelte Proliferation wurde durch einen Proliferationsassay durchgeführt. Die Zellproliferation wurde gemessen anhand des Einbaus von [ $^3\text{H}$ ]Thymidin über zwei h nach mehreren Tagen Kultur im 24-Well-Format. Die Etablierung der Methode wurde an T47D Zellen durchgeführt. Verschiedene Komponenten der üblichen Zellkulturmedien enthalten Estrogene, die in einem solchen Assay stören würden. Zuallererst ist hier das fetale Kälberserum (FKS) zu nennen, das als biologisches Produkt eine Vielzahl an Steroiden enthält, aber auch das in der Routine verwendete Phenolrot hat estrogene Wirkung (Berthois et al. 1986). Es war daher notwendig Versuchsbedingungen herzustellen, in denen diese Störfaktoren minimiert sind. So wurde auf den Einsatz von Phenolrot im Medium verzichtet und das FKS von Estrogenen befreit. Für letzteres standen zwei Alternativen zur Verfügung. Zum Einen der Bezug von dialysiertem FKS durch einen kommerziellen Anbieter (PAA, Cölbe). Zum anderen die Entfernung der Estrogene durch Behandlung des gewöhnlichen FKS mit Dextran-Charcoal (DCC). Beide Alternativen wurden in einem zweidimensionalen Versuchsansatz überprüft. Bei diesem Ansatz wurden der Gehalt an FKS im Medium und die Stimulierbarkeit der Zellproliferation durch Estradiol bestimmt. Eingesetzt wurden FKS-Konzentrationen von 1, 3, 5 und 10 % sowie Estradiolkonzentrationen von  $10^{-12}$  bis  $10^{-6}$  M gegen eine Estradiol-freie Kontrolle (Abb. 20). Über dieses aufwendige System ließ sich sehr gut zeigen, dass das DCC-FKS besser geeignet ist als die Estradiol-induzierte Proliferation zu demonstrieren. Die optimalen Bedingungen für eine möglichst hohe Estrogen-abhängige Proliferation gegen die Estradiol-freie Kontrolle waren gegeben bei einer DCC-FKS-Konzentration von 5 % und einer Estradiolkonzentration im Medium von  $10^{-9}$  M. Diese Estradiolkonzentration liegt über der in der Literatur üblicherweise angegebenen von  $5 \times 10^{-11}$  M. Da die maximale Proliferation unter Estradiol in den Proliferationsassays als Positivkontrolle eingesetzt werden sollte, wurde die Positivkontrolle doppelt geführt, sowohl bei  $10^{-9}$  als auch bei  $5 \times 10^{-11}$  M E<sub>2</sub>. Dies sollte eine

maximale Proliferation gewährleisten und gleichzeitig die Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten mit der Literatur. Die ermittelten Parameter wurden auch für die MCF7-Zelllinien verwendet. Nach dieser Etablierung des Assays wurden zur Bestimmung der Steroidsulfat-Sensitivität der Zellen E<sub>1</sub>S und DHEAS im Konzentrationsbereich von 10<sup>-12</sup> bis 10<sup>-4</sup> M eingesetzt.

Es zeigte sich, dass SOAT-transfizierte T47D-Zellen (T47Dsf3 Sammelklon) sensitiver auf E<sub>1</sub>S reagieren als die Kontrolle. Während die mit Leervektor transfizierten Zellen (T47Dpc3 Sammelklon) einen EC<sub>50</sub> für E<sub>1</sub>S von 21,7 ± 2,1 nM aufwiesen lag der EC<sub>50</sub> für die SOAT-transfizierten Zellen bei 2,2 ± 0,3 nM (Abb. 21). Die SOAT-Expression verursacht in den Zellen demnach eine 10fach höhere Sensitivität für E<sub>1</sub>S, verglichen mit der Kontrolle. Dass es sich hierbei tatsächlich um einen intrakrinen Effekt über den Estrogenrezeptor handelt konnte durch verschiedene Methoden belegt werden. Zum einen konnte die Expression des Estrogenrezeptors und eines der Schlüsselenzyme der intrakrinen Estrogensynthese, der STS, durch RT-PCR gezeigt werden (Abb. 16). Des Weiteren konnte durch die Koapplikation des Estrogenrezeptor-Antagonisten Tamoxifen sowie des STS-Inhibitors STX64 (677 *Coumate*) im Proliferationsassay die SOAT-vermittelte Proliferation unter E<sub>1</sub>S unterdrückt werden (Abb. 31).

Die Proliferationsstudien unter DHEAS ergaben für den T47Dsf3 Sammelklon leider keine vergleichbaren Ergebnisse. Es ließ sich zwar grundsätzlich eine Stimulierbarkeit durch DHEAS zeigen, allerdings ließ sich keine Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Effekte herstellen, die eine quantitative Bestimmung erlaubt hätte. Gleichzeitig waren die Effekte schlecht reproduzierbar (Abb. 22).

Für die MCF7-Zellen war keine Proliferationssteigerung nachweisbar. Weder mit Estradiol, noch mit Steroidsulfaten (Abb. 24, 25). Betrachtet man die absoluten Werte der [<sup>3</sup>H]Thymidinintegration, ist zu erkennen, dass die Estradiol-freie Negativkontrolle der MCF7-Zelllinien einen Einbau von etwa 200 fmol [<sup>3</sup>H]Thymidin/ml Lysat zeigt. Diesen Wert erreichen die T47D Zellen nur bei maximaler Stimulation. Es lässt sich also annehmen, dass die MCF7-Zelllinien auch ohne Estrogene im Medium bereits so stark proliferieren, dass ein Estrogeneffekt nicht erkennbar ist. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zur Literatur, die eine Stimulierbarkeit der Zelllinie MCF7 durch Estrogene beschreibt (Najid und Habrioux 1990; Paqualini et al 1990; Le Bail et al. 1998; Maggiolini et al. 1999; Billich et al. 2000; Schmitt et al. 2001; Nozawa et al. 2005).

Die Transfektion der T47D-Zellen mit dem shRNA-Vektor zeigten im Proliferationsassay unter den Steroidsulfaten keinen Effekt (Abb. 23). Es ist entweder anzunehmen, dass das SOAT-Expressionsniveau in den Zellen zu gering ist, als dass durch den knock down ein Effekt provozierbar ist, oder dass der knock down in den T47D Zellen nicht effektiv ist, obwohl die shRNA-Sequenz in stabil SOAT-transfizierten HEK293-Zellen überprüft worden war. In den

shRNA-Vektor-transfizierten MCF7-Zellen zeigt sich analog zu den SOAT-transfizierten MCF7-Zellen keine Stimulierbarkeit, weder mit  $E_1S$ , noch mit Estradiol, so dass ein shRNA-Effekt nicht bestimmbar war (Abb. 25).

Durch die bis zu diesem Punkt gewonnenen Daten konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des SOAT in T47D-Zellen zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber  $E_1S$  im Medium führt. Demnach könnte SOAT auch *in vivo* an der Tumorpherifation von Mammatumoren im postmenopausalen Patienten beteiligt sein.

Um als drug target bei der Therapie des Estrogen-abhängigen Mammatumors in Frage zu kommen, musste eine pharmakologische Beeinflussung der nachgewiesenen Effekte durch einen SOAT-Inhibitor gezeigt werden. Eine Hemmbarkeit der Effekte würde darüber hinaus noch untermauern, dass die beobachteten Veränderungen im Proliferationsverhalten auf die SOAT-Überexpression zurückzuführen sind.

Geyer et al. (2007) haben verschiedene Inhibitoren des SOAT beschrieben. Unter diesen wurden 5 in Hemmversuchen eingesetzt. Diese waren BSP,  $\alpha$ -Naphthyl-Sulfat, TLCS sowie 2- und 4-SMP. Die beiden nicht steroidalen Organosulfate 2- und 4-SMP erwiesen sich als potente Inhibitoren der SOAT-vermittelten Proliferation unter  $E_1S$ . Bei einer Konzentration von 25  $\mu M$  sowohl von 2- als auch von 4-SMP konnte der SOAT-vermittelte Effekt in zeitabhängiger Bestimmung der Proliferation SOAT-transfizierter Zellen unter 10 nM  $E_1S$  vollständig aufgehoben werden (Abb. 28). Eine unspezifische Inhibition der Proliferation durch toxische Effekte konnte durch eine unbeeinflusste Proliferation der Positivkontrolle unter  $E_2$  ausgeschlossen werden (Abb. 30). Weitere konzentrationsabhängige Versuche zeigten eine Hemmwirkung des 4-SMP bereits bei einer Konzentration von 0,1  $\mu M$  (Abb. 29).

BSP und  $\alpha$ -Naphthyl-Sulfat zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die  $E_1S$ -abhängige Proliferation (Abb. 26). TLCS erwies sich als Inhibitor ungeeignet, da es selbst einen proliferativen Effekt auf die SOAT-transfizierten T47D-Zellen hatte (Abb. 27).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die  $E_1S$ -Sensitivität der Estrogenrezeptor-positiven Mammatumor-Zelllinie T47D durch die Überexpression des Steroidsulfat-Transporters SOAT gesteigert wird und dieser Effekt durch die SOAT-Inhibitoren 2- und 4-SMP aufgehoben werden kann. *In vitro* zeigen sich also Hinweise dafür, dass SOAT als drug-target in der Therapie des Estrogen-abhängigen Mammatumors geeignet sein könnte.

*In vivo* stellt sich die Frage ob SOAT eine herausragende Bedeutung für den Steroidsulfattransport in malignem Brustgewebe hat.

Steroidsulfat-Transport in Form von DHEAS-Transport ist bereits von Reuter und Mayer (1995) an isolierten Ratten-Hepatozyten untersucht worden. Die Autoren fanden eine teilweise Natrium-abhängige Aufnahme in die Zellen mit einem  $K_m$ -Wert von 17  $\mu M$ . Diese Aufnahme konnte durch Hemmstoffe der mitochondrialen Atmungskette,  $NH_2$ - und SH-Gruppenblocker, Gallensäuren und das Natrium-Ionophor Monensin gehemmt werden. Allerdings waren sie

nicht durch Blockade der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase hemmbar. Für primäre menschliche Trophoblasten-Kulturen und die plazentare Zelllinie HRP-1 ist ein katalysierter DHEAS-Transport ebenfalls beschrieben worden (Ugele et al. 2003; Zhou et al. 2003). In Trophoblasten konnten Ugele et al. (2003) einen DHEAS-Transport zeigen, der einen K<sub>m</sub>-Wert von 26 ± 7,6 µM aufweist und teilweise Natrium-abhängig ist.

Steroidsulfate sind Substrate verschiedener Transporter. Die Entdeckung und Publikation von Steroidsulfat-Transport durch bekannte Transporter, bzw. die Identifikation neuer Steroidsulfat-Transporter hat in den letzten Jahren stark zugenommen, da Steroidsulfate vermehrt in den Focus der Wissenschaft gerieten. Im Laufe dieser Entwicklung wurde auch die Taxonomie der Transporter überarbeitet. Im Folgenden werden die Transporter mit der aktuellen Bezeichnung benannt. Einen Schlüssel zu den in der Literatur verwendeten Synonymen bietet Tabelle 28.

Tab. 28: Bekannte Steroidsulfat-Transporter

<b>Aktuelle Bezeichnung</b>	<b>Synonyme</b>	<b>Gen</b>	<b>Referenz</b>	<b>Datenbank- eintrag</b>
SOAT	-	SLC10A6	Geyer et al. 2004	NM_197965
OATP1A2	OATP-A	SLCO1A2	Kullak-Ublick et al. 2001	NM-021094
OATP2B1	OATP-B	SLCO2B1	Kullak-Ublick et al. 2001 Pizzagalli et al. 2003 Nozawa et al. 2004-B Satoh et al. 2005	NM-007256
OATP1B1	OATP-C	SLO1B1	Kullak-Ublick et al. 2001	NM_006446
OATP1B3	OATP-8	SLCO1B3	Kullak-Ublick et al. 2001	NM-019844
OATP3A1	OATP-D	SLCO3A1	Tamai et al. 2000	NM-013272
OARP4A1	OATP-E	SLCO4A1	Tamai et al. 2000 Alcorn et al. 2002	NM-016354
OATP1C1	OATP-F	SLCO1C1	Pizzagalli et al. 2002	NM-017435
OATP6A1	GST	SLCO6A1	Suzuki et al. 2003-B	NM-173488
NTCP	-	SLC10A1	Schröder et al. 1998	NM-003049
OAT2	-	SLC22A7	Kobayashi et al. 2005	NM-006672
OAT3	-	SLC22A8	Kusuhara et al. 1999	NM-004254
OAT4	-	SLC22A11	Cha et al. 2000	NM-018484
OAT5	-	SLC22A10	Kwak et al. 2005	AP-003420
OAT6	-	SLC22A20	Schnabolk et al. 2006	NM-001004326

Steroidsulfat-Transport wurde nachgewiesen für Mitglieder der Familien der SLC10 oder ehemals Natrium/Gallensäuretransporter-Familie, SLCO/SLC21 oder Organic anion transporting family (OATPs) und der organic cation/anion/zwitterion transporter family (OATs). Unter den OATPs wurde Steroidsulfat-Transport nachgewiesen für den OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 (Kullak-Ublick et al. 2001), OATP1C1 (Pizzagalli et al. 2002), OATP2B1 (Kullak-Ublick et al. 2001; Pizzagalli et al. 2003; Nozawa et al. 2004-B; Satoh et al. 2005), OATP3A1 (Tamai et al. 2000) und OATP6A1 (Suzuki et al. 2003-B). Für die OATs wurde er gezeigt für OAT2 (Kobayashi et al. 2005), -3 (Kusuhara et al. 1999), -4 (Cha et al. 2000), -5 (Kwak et al. 2005) und -6 (Schnabolk et al. 2006). In der Transporterfamilie SLC10, bisher bezeichnet als Natrium/Gallensäuretransporter-Familie, ist Steroidsulfat-Transport beschrieben für das Natrium-Taurocholat Cotransporting Polypeptide (NTCP, Schröder et al. 1998) und seit 2004 auch für den SOAT, der im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern dieser Familie keine Gallensäuren transportiert (Geyer et al. 2004).

In gesunden Mamma-Epithelzellen, gewonnen aus frischer Muttermilch, konnten Alcorn et al. (2002) mRNA-Transkripte der Transporter OATP1A2, OATP2B1, OATP3A1 und OATP4A1 nachweisen, wohingegen OAT2, OAT3, OAT4 und OATP1B1 durch RT-PCR nicht nachweisbar waren. Für gesundes Mammagewebe konnten Ugele et al. (persönliche Information) diese Daten für OATP1A2 und OATP2B1 bestätigen. Pizzagalli et al. (2003) konnten den OATP2B1 immunhistochemisch in einem invasiven duktalen Mammakarzinom nachweisen.

In T47D-Zellen konnten Nozawa et al. (2004-A) eine E<sub>1</sub>S-Aufnahme mit einem  $K_m$  von  $7,6 \pm 1,2 \mu\text{M}$  zeigen, die Natrium-unabhängig war. Unabhängig voneinander zeigten Nozawa et al. (2004-A) und Pizzagalli et al. (2003) mRNA-Transkripte von zwei, der von Alcorn et al. (2002) in Mammaepithelzellen nachgewiesenen Transportern, namentlich OATP3A1 und OATP4A1. Nozawa et al. (2004-A) konnten dahingegen in T47D-Zellen keine mRNA für OATP2B1 und OATP1A2 nachweisen, ebenso wenig für OATP1B1, -1B3, -1C1 sowie OAT1, -2, -3 und -4. Ein Nachweis der mRNA des OATP2B1 in T47D- und MCF7-Zellen gelang auch Pizzagalli et al. (2003) nicht.

Ugele et al. (persönliche Information) konnte ebenfalls weder in kultivierten Mamma-Epithelzellen, noch in den Mammatumorzelllinien T47D, MCF7, MDA-MB-231 und SKBR-3 eine Expression der Transporter OATP2B1 und OATP1A2 nachweisen.

Eine Expression des SOAT wurde von Meerkamp et al. (2008) in gesundem und entartetem Mammagewebe auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Geyer et al. (unpublizierte Daten) konnten eine SOAT-Transkription in kultivierten Mammaepithelzellen (hMEC) und den etablierten Mammakarzinom-Zelllinien T47D, MCF7, SK-BR-3 und MDA-MB-231 durch RT-PCR nachweisen.

Neben dem bisher beschriebenen Import können Steroid-Sulfate auch über verschiedene Transporter aus den Zellen heraustransportiert werden. Steroidsulfat-Transport in Richtung Extrazellulärraum ist für fünf Mitglieder der ATP-Binding-Cassette (ABC)-Transporter-Familie beschrieben. Diese sind das Breast-Cancer-Resistance-Protein (BCRP) und die Multidrug-Resistance Proteine (MRP) 1, 2, 4, und 8.

Das BCRP, das aus einer auf Doxorubicin und Verapamil selektierten MCF7 Zelllinie kloniert wurde (Doyle et al. 1998) und das in der Plazenta, im Darm, der Leber, den Eierstöcken, den Hoden, der Niere, dem Gehirn und in hämatopoietischen Stammzellen exprimiert wird (Allikmets et al. 1998; Doyle et al. 1998; Zhou et al. 2001), transportiert E<sub>1</sub>S und DHEAS (Imai et al. 2003).

Die ABC-Transporter MRP-1 und -4 transportieren DHEAS mit hoher Affinität. Für den MRP-1 wurde ein K<sub>m</sub>-Wert von 5 µM bestimmt, für den MRP-4 2 µM (Zelcer et al. 2003). MRP-2 ist auf der apikalen Membran von Hepatozyten exprimiert und transportiert unter anderem Bilirubin-Glukuronid. Er wurde lange als cMOAT bezeichnet und ein Defekt in seinem Gen verursacht das Dubin-Johnson Syndrom. Neben diesem endogenen Substrat scheint auch der MRP-2 Zytostatika wie Doxorubicin und Vinca-Alkaloide zu transportieren, da eine Transfektion von HepG2-Zellen mit MRP-2-cDNA zu einer verringerten Empfindlichkeit auf diese Substanzen führt (Borst et al. 2000). Es wurde aber auch gezeigt, dass der MRP-2 E<sub>1</sub>S und DHEAS transportiert (Spears et al. 2005). Der MRP-8 ist der jüngst bekannte Vertreter der MRP-Gruppe und wurde aus einer cDNA-Bank der Prostata kloniert (Guo et al. 2003). Er transportiert neben zyklischen Nukleotiden DHEAS und glukuronidierte Steroide (Chen et al. 2005).

Die dargestellten Publikationen zeigen auf, dass am Transport von Steroidsulfaten, bzw. an der Nettoaufnahme verschiedene zelleinwärts und –auswärts wirkende Transporter beteiligt sind. Der Expressionsgrad von Transportern kann sich während der Transformation von Zellen verändern. So zeigten Filipits et al. (1999), dass das Expressionsniveau des MRP1 in Brustkrebsgewebe stark variiert und Vergleichbares wurde durch Dexter et al. (1998) für das P-Glykoprotein gezeigt, ein weiterer ABC-Transporter, der eine Mehrfachresistenz gegen Zytostatika vermitteln kann.

Der Nachweis SOAT-spezifischer mRNA in klinischen Mammakarzinom-Proben (Meerkamp et al. 2008) lässt aber die Hypothese zu, dass SOAT *in vivo* Bedeutung für den Steroidsulfat-Transport in Brustkrebsgewebe hat.

Für die medikamentöse Therapie von Mammakarzinomen bestehen zurzeit verschiedene Ansätze. Zum einen die klassische Chemotherapie. Die klassische Chemotherapie erfolgt nach dem CMF-Prinzip mit den Substanzen Cyclophosphamid, Metotrexat und 5-Fluorouracil. Eine Chemotherapie wird vorzugsweise bei ER-negativen Tumoren angewandt (Schneider et al. 1994).

Zur zytotoxischen Chemotherapie kommt bei der adjuvanten Behandlung des Mammakarzinoms auch die antiendokrine Therapie zum Einsatz. Bei der antiendokrinen Therapie des Mammakarzinoms wird das Wachstum der Tumorzellen durch einen Einfluss auf die Estrogenstimulation gehemmt. Sie ist bei Patientinnen mit Hormonrezeptor-positiven Tumoren ein wesentlicher Bestandteil der Therapie.

Ungefähr zwei Drittel aller Mammakarzinome sind Estrogenrezeptor-positiv. Neben der Ovariectomie oder dem Einsatz von GnRH-Analoga, z.B. Goselerin, welche bei prämenopausalen Patientinnen angewandt werden existieren aktuell drei Möglichkeiten den Estrogeneinfluss auf die Tumorzellen medikamentell zu verhindern.

Zum einen besteht die Möglichkeit der Blockade der Estrogenrezeptoren. Tamoxifen als Vertreter der Gruppe der selektiven Estrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM) wird seit Jahren als Standardtherapie des Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinoms verabreicht. Ein neuerer, selektiver Estrogenrezeptor-Modulator, Raloxifen, bislang zur Prävention und Behandlung der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen verwendet, zeigt in einer US-amerikanischen Studie bei postmenopausalen Frauen eine gleich gute Primärprävention des Brustkrebses wie Tamoxifen, bei besserer Verträglichkeit (Yalcin et al. 2005). Die Hemmung der Estrogensynthese durch Aromatasehemmer verhindert die Umwandlung von Androstendion und Testosteron in  $E_1$  und  $E_2$ . Bei postmenopausalen Frauen ist die Umwandlung von Androgenen aus der Nebennierenrinde in Estrogene die wichtigste Estrogenquelle. Studien zeigten, dass im primären Einsatz Aromatasehemmer Tamoxifen überlegen sind (Mouridsen und Robert 2005).

Ein weiterer Ansatz besteht in der Hemmung der STS, ohne deren Aktivität die Steroide als Sulfate den Estrogenrezeptor nicht binden können. Der auch in dieser Arbeit eingesetzte STS-Inhibitor STX64 wurde bereits klinisch geprüft und zeigte vielversprechende Ergebnisse (Stanway et al. 2006).

Aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten Daten konnte gezeigt werden, dass SOAT an der  $E_1$ S-abhängigen Proliferation von kultivierten Mammatumorzellen beteiligt ist. Diese Ergebnisse bieten möglicherweise einen neuen Ansatzpunkt in der Therapie Estrogen-abhängiger Mammatumore.

## 7 Zusammenfassung

Im Jahre 2004 wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität in Giessen ein neues Transportprotein kloniert, das aufgrund seiner Substrate als Sodium-dependent Organic Anion Transporter, (SOAT) bezeichnet wurde. Wegen seiner Sequenzhomologie wurde der SOAT als SLC10A6 der SLC10-Familie zugeordnet, die bis dahin als Natrium/Gallensäuretransporter-Familie bezeichnet wurde. Im Gegensatz zu den bis dahin bekannten Mitgliedern der SLC10 -Familie NTCP und ASBT transportiert SOAT keine Gallensäuren. Zu seinen Substraten zählen die sulfatierten Steroide Estron-3-sulfat ( $E_1S$ ), Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) und Pregnenolonsulfat. Sulfatierte Steroide spielen eine herausragende Bedeutung im Zusammenhang mit Estrogen-abhängigen Mammatumoren beim Menschen. Zwei Drittel des Brustkrebses treten in der postmenopausalen Phase auf. Der wesentliche Teil dieser Tumore ist Estrogen-abhängig, obwohl in dieser Lebensphase die Plasmaspiegel aktiver Estrogene unter dem biologisch wirksamen Niveau liegen. Es finden sich aber auch in der Postmenopause micromolare Konzentrationen der sulfatierten Steroide  $E_1S$  und DHEAS im Plasma. Diese können im Mammatumorgewebe nach Aufnahme in die Zellen in einer intrakrinen Synthese in die aktiven Estrogene Estron ( $E_1$ ) und Estradiol ( $E_2$ ) umgewandelt werden.

Aufgrund seines Substratspektrums und seiner nachgewiesenen Expression in Mammatumorgewebe ist SOAT möglicherweise an der intrakrinen Synthese von Estrogenen in Brustkrebsgewebe beteiligt. Um die Bedeutung des SOAT für die Steroidsulfat-abhängige Proliferation von Mammatumoren zu untersuchen, wurde die Estrogen-abhängige Mammatumor-Zelllinie T47D mit einem Expressionsvektor des SOAT transfiziert. Funktionelle Expression des Proteins wurde überprüft durch RT-PCR und Aufnahmemessungen mit [ $^3H$ ] $E_1S$ . Die Sensitivität der Zellen für  $E_1S$  wurde in einem Proliferationsassay in Form des  $EC_{50}$  der  $E_1S$ -Konzentration im Medium bestimmt.

Es zeigte sich, dass SOAT-transfizierte T47D-Zellen mit einem  $EC_{50}$  von  $2,2 \pm 0,3$  nM eine 10fach höhere Sensitivität für  $E_1S$  aufweisen als die Kontrollen mit  $21,7 \pm 2,1$  nM. Dieser Effekt war durch den Estrogenrezeptor-Antagonisten Tamoxifen und den Steroidsulfatase-Inhibitor STX64 hemmbar, wodurch gezeigt werden konnte, dass der SOAT-Effekt Estrogenrezeptor-abhängig und an die intrakrine Synthese von Estrogenen aus  $E_1S$  gekoppelt ist. Darüber hinaus war die SOAT-vermittelte Proliferation hemmbar durch die SOAT-Inhibitoren 2-und 4-Sulfooxymethylpyren.

Es konnte somit gezeigt werden, dass SOAT an der  $E_1S$ -vermittelten Proliferation von Mammatumoren beteiligt sein kann und dass der Einfluss des SOAT durch spezifische Hemmstoffe aufgehoben werden kann. SOAT ist demnach als Target für die antiendokrine Therapie von Estrogen-abhängigen Mammatumoren vorstellbar.



## 8 Summary

At the Institute of Pharmacology and Toxicology of the Justus-Liebig-University in Giessen in 2004 a new Transporter was cloned, that because of its substrates was called Sodium dependent Organic Anion Transporter (SOAT). Due to its sequence homology it was classified as SLC10A6 in the SLC10-family, hitherto called sodium bile salt cotransport family. In contrast to the other members of the SLC10-family, NTCP and ASBT, SOAT does not transport bile acids. To its substrates belong the sulfated steroids estrone-3-sulfate ( $E_1S$ ), dehydroepiandrosterone sulfate and pregnenolone sulfate.

Sulfated steroids play an important role in the context of estrogen dependent breast cancer in women. Two third of the mamma tumors occur in the postmenopausal period of life, despite the fact, that the plasma levels of active estrogens in this period is below biological effective concentrations. In contrast sulfated steroids are still present in the plasma in micro molar concentrations. These are precursors for the intrakrine synthesis of the active estrogens estrone ( $E_1$ ) and estradiol ( $E_2$ ) in breast cancer tissue after uptake in the cells.

Because of its substrate spectrum and proved expression in mamma tumor tissue SOAT may be involved in intrakrine estrogen synthesis in breast cancer. To clear the significance of SOAT in this context, the estrogen dependent breast cancer cell line T47D was transfected with an expression vector for SOAT. Functional expression of SOAT in the transfected cell line was proved by RT-PCR and uptake measurements with [ $^3H$ ] $E_1S$ .

$E_1S$  sensivity was determined as  $EC_{50}$  of  $E_1S$  concentration in a proliferation assay. In this assay SOAT transfected T47D cells showed with an  $EC_{50}$  of  $2,2 \pm 0,3$  nM a 10fold enhanced sensitivity to  $E_1S$  compared to control ( $EC_{50}$   $21,7 \pm 2,1$  nM). This effect was reversible by the estrogen receptor antagonist tamoxifen and the steroid sulfatase inhibitor STX64. Thereby the estrogen receptor dependence of the SOAT effect could be shown as well as the coupling to the intrakrine synthesis of free estrogens. Furthermore the SOAT mediated proliferation was inhibited by the SOAT inhibitors 2- and 4-sulfooxymethylpyrene.

In summary the study shows, that SOAT may be involved in  $E_1S$  mediated proliferation of breast cancer and that its impact can be inhibited by specific inhibitors. Thereby SOAT is conceivable as target in the pharmacological therapy of breast cancer.

## 9 Literaturverzeichnis

- Abul-Hajj Y. J. 1975. Metabolism of dehydroepiandrosterone by hormone dependent and hormone independent human breast carcinoma. *Steroids* 26, 488-500.
- Alcorn J., Lu X., Moscow J. A., and McNamara P. J. 2002. Transporter gene expression in lactating and nonlactating human mammary epithelial cells using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 303, 487-496.
- Allikmets R., Schriml L. M., Hutchinson A., Romano-Spica V., and Dean M. 1998. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* 58, 5337-5339.
- Almog N., Li R., Peled A., Schwartz D., Wolkowicz R., Goldfinger N., Pei H., and Rotter V. 1997. The murine C'-terminally alternatively spliced form of p53 induces attenuated apoptosis in myeloid cells. *Mol.Cell Biol.* 17, 713-722.
- Anderson L. J. and Jarrett W. F. 1966. Mammary neoplasia in the dog and cat. II. Clinico-pathological aspects of mammary tumours in the dog and cat. *J.Small Anim Pract.* 7, 697-701.
- Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2004
- Baulieu E. E. 1996. Dehydroepiandrosterone (DHEA): a fountain of youth? *J.Clin.Endocrinol.Metab* 81, 3147-3151.
- Beato M. 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335-344.
- Beato M., Herrlich P. , and Schutz G. 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83, 851-857.
- Beato M. and Klug J. 2000. Steroid hormone receptors: an update. *Hum.Reprod.Update.* 6, 225-236.
- Berthois Y., Katzenellenbogen J. A., and Katzenellenbogen B. S. 1986. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83, 2496-2500.
- Billich A., Nussbaumer P., and Lehr P. 2000. Stimulation of MCF-7 breast cancer cell proliferation by estrone sulfate and dehydroepiandrosterone sulfate: inhibition by novel non-steroidal steroid sulfatase inhibitors . *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 73 , 225-235.
- Blanco G. and Mercer R. W. 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am.J.Physiol* 275, F633-F650.
- Borst P., Evers R., Kool M., and Wijnholds J. 2000. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J.Natl.Cancer Inst.* 92, 1295-1302.
- Borst P. and Elferink R. O. 2002. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu.Rev.Biochem.* 71, 537-592.
- Carlstrom K. 1984. Influence of intratumoral estradiol biosynthesis on estrogen receptors. *Recent Results Cancer Res.* 91, 145-149.

- Cha S. H., Sekine T., Kusuhara H., Yu E., Kim J. Y., Kim D. K., Sugiyama Y., Kanai Y., and Endou H. 2000. Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta. *J.Biol.Chem.* 275, 4507-4512.
- Chen N. H., Reith M. E., and Quick M. W. 2004. Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch.* 447, 519-531.
- Chen Z. S., Guo Y., Belinsky M. G., Kotova E., and Kruh G. D. 2005. Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). *Mol.Pharmacol.* 67, 545-557.
- Chetrite G. S., Cortes-Prieto J., Philippe J. C., Wright F., and Pasqualini J. R. 2000. Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 72, 23-27.
- Craddock A. L., Love M. W., Daniel R. W., Kirby L. C., Walters H. C., Wong M. H., and Dawson P. A. 1998. Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am.J.Physiol* 274, G157-G169.
- Dexter D. W., Reddy R. K., Geles K. G., Bansal S., Myint M. A., Rogakto A., Leighton J. C., and Goldstein L. J. 1998. Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction measured expression of MDR1 and MRP in primary breast carcinoma. *Clin.Cancer Res.* 4, 1533-1542.
- Doyle L. A., Yang W. , Abruzzo L. V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A. K., and Ross D. D. 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 15665-15670.
- Duffy M. J. 2005. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin.Chem.* 51, 494-503.
- el Deiry W. S. 1998. Regulation of p53 downstream genes. *Semin.Cancer Biol.* 8, 345-357.
- Evans T. R., Rowlands M. G., Luqmani Y. A., Chander S. K., and Coombes R. C. 1993. Detection of breast cancer-associated estrone sulfatase in breast cancer biopsies and cell lines using polymerase chain reaction. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 46, 195-201.
- Evans T. R., Rowlands M. G., Law M., and Coombes R. C. 1994. Intratumoral oestrone sulphatase activity as a prognostic marker in human breast carcinoma. *Br.J.Cancer* 69, 555-561.
- Fernandes C. F., Godoy J. R., Doring B., Cavalcanti M. C., Bergmann M., Petzinger E., and Geyer J. 2007. The novel putative bile acid transporter SLC10A5 is highly expressed in liver and kidney. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 361, 26-32.
- Filipits M., Malayeri R., Suchomel R. W., Pohl G., Stranzl T., Dekan G., Kaider A., Stiglbauer W., Depisch D., and Pirker R. 1999. Expression of the multidrug resistance protein (MRP1) in breast cancer. *Anticancer Res.* 19, 5043-5049.
- Geisler J. 2003. Breast cancer tissue estrogens and their manipulation with aromatase inhibitors and inactivators. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 86, 245-253.
- Geraldes M., Gartner F., and Schmitt F. 2000. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Vet.Rec.* 146, 403-406.

Gesundheitsberichterstattung des Bundes-Robert Koch Institut Mai 2005

Geyer J., Godoy J. R., and Petzinger E. 2004. Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 316 , 300-306.

Geyer J., Wilke T., and Petzinger E. 2006. The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 372, 413-431.

Geyer J., Doring B., Meerkamp K., Ugele B., Bakhiya N., Fernandes C. F., Godoy J. R., Glatt H., and Petzinger E. 2007. Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J.Biol.Chem.* 282, 19728-19741.

Geyer J., Fernandes C. F., Doring B., Burger S., Godoy J. R., Rafalzik S., Hubschle T., Gerstberger R., and Petzinger E. 2008. Cloning and molecular characterization of the orphan carrier protein Slc10a4: expression in cholinergic neurons of the rat central nervous system. *Neuroscience* 152, 990-1005.

Godoy J. R., Fernandes C., Doring B., Beuerlein K., Petzinger E., and Geyer J. 2007. Molecular and phylogenetic characterization of a novel putative membrane transporter (SLC10A7), conserved in vertebrates and bacteria. *Eur.J.Cell Biol.* 86, 445-460.

Graeber T. G., Osmanian C., Jacks T., Housman D. E., Koch C. J., Lowe S. W., and Giaccia A. J. 1996. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379, 88-91.

Gunnarsson C., Olsson B. M., and Stal O. 2001. Abnormal expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in breast cancer predicts late recurrence. *Cancer Res.* 61, 8448-8451.

Guo Y., Kotova E., Chen Z. S., Lee K., Hopper-Borge E., Belinsky M. G., and Kruh G. D. 2003. MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *J.Biol.Chem.* 278, 29509-29514.

Hagenbuch B. and Dawson P. 2004. The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch.* 447, 566-570.

Hall J. M. and McDonnell D. P. 1999. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140, 5566-5578.

Hamann U. 2000. Hereditary breast cancer: high risk genes, genetic testing and clinical implications. *Clin.Lab* 46, 447-461.

Hayden D. W., Barnes D. M., and Johnson K. H. 1989. Morphologic changes in the mammary gland of megestrol acetate-treated and untreated cats: a retrospective study. *Vet.Pathol.* 26, 104-113.

Hediger M. A., Romero M. F., Peng J. B., Rolfs A., Takanaga H., and Bruford E. A. 2004. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflugers Arch.* 447, 465-468.

Henderson B. E., Ross R., and Bernstein L. 1988. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res.* 48, 246-253.

- Henderson I. C. and Canellos G. P. 1980. Cancer of the breast: the past decade (second of two parts). *N.Engl.J.Med.* 302, 78-90.
- Hoffmann R. and Happle R. 1999. [Alopecia areata. 1: Clinical aspects, etiology, pathogenesis]. *Hautarzt* 50, W222-W231.
- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., and Harris C. C. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.
- Illera J. C., Perez-Alenza M. D., Nieto A., Jimenez M. A., Silvan G., Dunner S., and Pena L. 2006. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids* 71, 541-548.
- Imai Y., Asada S., Tsukahara S., Ishikawa E., Tsuruo T., and Sugimoto Y. 2003. Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol.Pharmacol.* 64, 610-618.
- Israel N. and Saez S. 1978. Relation between steroid receptor content and the response to hormone addition in isolated human breast cancer cells in short-term culture. *Cancer Res.* 38, 4314-4317.
- James M. R., Skaar T. C., Lee R. Y., MacPherson A., Zwiebel J. A., Ahluwalia B. S., Ampy F., and Clarke R. 2001. Constitutive expression of the steroid sulfatase gene supports the growth of MCF-7 human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Endocrinology* 142, 1497-1505.
- Jazaeri O., Shupnik M. A., Jazaeri A. A., and Rice L. W. 1999. Expression of estrogen receptor alpha mRNA and protein variants in human endometrial carcinoma. *Gynecol.Oncol.* 74, 38-47.
- Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Murray T., and Thun M. J. 2008. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J.Clin.* 58, 71-96.
- Joyeux A., Balaguer P., Germain P., Boussioux A. M., Pons M., and Nicolas J. C. 1997. Engineered cell lines as a tool for monitoring biological activity of hormone analogs. *Anal.Biochem.* 249, 119-130.
- Kobayashi Y., Ohshiro N., Sakai R., Ohbayashi M., Kohyama N., and Yamamoto T. 2005. Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 [SLC22A7]). *J.Pharm.Pharmacol.* 57, 573-578.
- Kramer W., Wess G., Schubert G., Bickel M., Girbig F., Gutjahr U., Kowalewski S., Baringhaus K. H., Enhsen A., Glombik H., and . 1992. Liver-specific drug targeting by coupling to bile acids. *J.Biol.Chem.* 267, 18598-18604.
- Kramer W. and Wess G. 1996. Bile acid transport systems as pharmaceutical targets. *Eur.J.Clin.Invest* 26, 715-732.
- Krishnan V., Heath H., and Bryant H. U. 2000. Mechanism of action of estrogens and selective estrogen receptor modulators. *Vitam.Horm.* 60, 123-147.
- Kuiper G. G., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S., and Gustafsson J. A. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 5925-5930.

- Kullak-Ublick G. A., Ismail M. G., Stieger B., Landmann L., Huber R., Pizzagalli F., Fattinger K., Meier P. J., and Hagenbuch B. 2001. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120, 525-533.
- Kumar V. and Chambon P. 1988. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 55, 145-156.
- Kusuhara H., Sekine T., Utsunomiya-Tate N., Tsuda M., Kojima R., Cha S. H., Sugiyama Y., Kanai Y., and Endou H. 1999. Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. *J.Biol.Chem.* 274, 13675-13680.
- Kwak J. O., Kim H. W. , Oh K. J., Ko C. B., Park H., and Cha S. H. 2005. Characterization of mouse organic anion transporter 5 as a renal steroid sulfate transporter. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 97, 369-375.
- Labrie F. 1991. Intracrinology. *Mol.Cell Endocrinol.* 78, C113-C118.
- Labrie F., Belanger A., Luu-The V., Labrie C., Simard J., Cusan L., Gomez J. L., and Candas B. 1998. DHEA and the intracrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues: its role during aging. *Steroids* 63, 322-328.
- Le Bail J. C., Marre-Fournier F., Nicolas J. C., and Habrioux G. 1998. C19 steroids estrogenic activity in human breast cancer cell lines: importance of dehydroepiandrosterone sulfate at physiological plasma concentration. *Steroids* 63, 678-683.
- Le Bail J. C., Lotfi H., Charles L., Pepin D., and Habrioux G. 2002. Conversion of dehydroepiandrosterone sulfate at physiological plasma concentration into estrogens in MCF-7 cells. *Steroids* 67, 1057-1064.
- Legler J., van den Brink C. E., Brouwer A., Murk A. J., van der Saag P. T., Vethaak A. D., and van der B. B. 1999. Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicol.Sci.* 48, 55-66.
- Levine A. J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Lowe S. W. and Ruley H. E. 1993. Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev.* 7, 535-545.
- Maggiolini M., Donze O., Jeannin E., Ando S., and Picard D. 1999. Adrenal androgens stimulate the proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor alpha. *Cancer Res.* 59, 4864-4869.
- Maggiolini M., Carpino A., Bonofiglio D., Pezzi V., Rago V., Marsico S., Picard D., and Ando S. 2001. The direct proliferative stimulus of dehydroepiandrosterone on MCF7 breast cancer cells is potentiated by overexpression of aromatase. *Mol.Cell Endocrinol.* 184, 163-171.
- Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., and Evans R. M. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Meerkamp K., Zaichuk T., Ugele B., Petzinger E. and Geyer J. 2008. Expression of steroid sulfatase (STS) and sodium-dependent organic anion transporter (SOAT) in breast cancer. *Nauny-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 388, (1), 11.

- Miettinen M., Mustonen M., Poutanen M., Isomaa V., Wickman M., Soderqvist G., Vihko R., and Vihko P. 1999. 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenases in normal human mammary epithelial cells and breast tissue. *Breast Cancer Res. Treat.* 57, 175-182.
- Millanta F., Calandrella M., Bari G., Niccolini M., Vannozzi I., and Poli A. 2005. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res. Vet. Sci.* 79, 225-232.
- Misdorp W. 1991. Progestagens and mammary tumours in dogs and cats. *Acta Endocrinol.(Copenh)* 125 Suppl 1, 27-31.
- Miyoshi Y., Ando A., Shiba E., Taguchi T., Tamaki Y., and Noguchi S. 2001. Involvement of up-regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in maintenance of intratumoral high estradiol levels in postmenopausal breast cancers. *Int.J.Cancer* 94, 685-689.
- Moe L. 2001. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J.Reprod.Fertil.Suppl* 57, 439-443.
- Morris K. T., Toth-Fejel S., Schmidt J., Fletcher W. S. , and Pommier R. F. 2001. High dehydroepiandrosterone-sulfate predicts breast cancer progression during new aromatase inhibitor therapy and stimulates breast cancer cell growth in tissue culture: a renewed role for adrenalectomy. *Surgery* 130, 947-953.
- Mouridsen H. T. and Robert N. J. 2005. Benefit with aromatase inhibitors in the adjuvant setting for postmenopausal women with breast cancer. *MedGenMed.* 7, 20.
- Najid A. and Habrioux G. 1990. Biological effects of adrenal androgens on MCF-7 and BT-20 human breast cancer cells. *Oncology* 47, 269-274.
- Nelson W. G. and Kastan M. B. 1994. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol.Cell Biol.* 14, 1815-1823.
- Newman S. P., Purohit A., Ghilchik M. W., Potter B. V., and Reed M. J. 2000. Regulation of steroid sulphatase expression and activity in breast cancer. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 75, 259-264.
- Nozawa T., Suzuki M. , Takahashi K., Yabuuchi H., Maeda T., Tsuji A., and Tamai I. 2004-A. Involvement of estrone-3-sulfate transporters in proliferation of hormone-dependent breast cancer cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 311, 1032-1037.
- Nozawa T., Imai K., Nezu J., Tsuji A., and Tamai I. 2004-B. Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 308, 438-445.
- Nozawa T., Suzuki M. , Yabuuchi H., Irokawa M., Tsuji A., and Tamai I. 2005. Suppression of cell proliferation by inhibition of estrone-3-sulfate transporter in estrogen-dependent breast cancer cells. *Pharm.Res.* 22, 1634-1641.
- Nussbaumer P. and Billich A. 2005. Steroid sulfatase inhibitors: their potential in the therapy of breast cancer. *Curr.Med.Chem.Anticancer Agents* 5, 507-528.
- Osborne C. K. 1998. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N.Engl.J.Med.* 339, 1609-1618.

- Osborne C. K. and Schiff R. 2005. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J.Clin.Oncol.* 23, 1616-1622.
- Papendorp J. T., Schatz R. W., Soto A. M., and Sonnenschein C. 1985. On the role of 17 alpha-estradiol and 17 beta-estradiol in the proliferation of MCF7 and T47D-A11 human breast tumor cells. *J.Cell Physiol* 125, 591-595.
- Pasqualini J. R., Gelly C., Nguyen B. L., and Vella C. 1989. Importance of estrogen sulfates in breast cancer. *J.Steroid Biochem.* 34, 155-163.
- Pasqualini J. R., Gelly C., and Nguyen B. L. 1990. Metabolism and biologic response of estrogen sulfates in hormone-dependent and hormone-independent mammary cancer cell lines. Effect of antiestrogens. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 595, 106-116.
- Pasqualini J. R., Maloche C., Maroni M., and Chetrite G. 1994. Effect of the progestagen Promegestone (R-5020) on mRNA of the oestrone sulphatase in the MCF-7 human mammary cancer cells. *Anticancer Res.* 14, 1589-1593.
- Pasqualini J. R., Chetrite G., Blacker C., Feinstein M. C., Delalonde L., Talbi M., and Maloche C. 1996. Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 81, 1460-1464.
- Pasqualini J. R., Cortes-Prieto J., Chetrite G., Talbi M., and Ruiz A. 1997. Concentrations of estrone, estradiol and their sulfates, and evaluation of sulfatase and aromatase activities in patients with breast fibroadenoma. *Int.J.Cancer* 70, 639-643.
- Pasqualini J. R. 2003. Differential effects of progestins on breast tissue enzymes. *Maturitas* 46 Suppl 1, S45-S54.
- Pasqualini J. R. 2004. The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review. *Biochim.Biophys.Acta* 1654, 123-143.
- Pasqualini J. R. and Chetrite G. S. 2005. Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 93, 221-236.
- Perez-Alenza M. D., Jimenez A., Nieto A. I., and Pena L. 2004. First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. *Breast Cancer Res.* 6, R300-R307.
- Petzinger E., Nickau L., Horz J. A., Schulz S., Wess G., Enhsen A., Falk E., Baringhaus K. H., Glombik H., Hoffmann A., and . 1995. Hepatobiliary transport of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors conjugated with bile acids. *Hepatology* 22, 1801-1811.
- Pizzagalli F., Hagenbuch B., Stieger B., Klenk U., Folkers G., and Meier P. J. 2002. Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Mol.Endocrinol.* 16, 2283-2296.
- Pizzagalli F., Varga Z., Huber R. D., Folkers G., Meier P. J., and St Pierre M. V. 2003. Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 88, 3902-3912.



- Platia M. P., Fencel M. D., Elkind-Hirsch K. E., Canick J. A., and Tulchinsky D. 1984. Estrone sulfatase activity in the human brain and estrone sulfate levels in the normal menstrual cycle. *J.Steroid Biochem.* 21, 237-241.
- Poutanen M., Moncharmont B., and Vihko R. 1992. 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression in human breast cancer cells: regulation of expression by a progestin. *Cancer Res.* 52, 290-294.
- Priester W. A. 1979. Occurrence of mammary neoplasms in bitches in relation to breed, age, tumour type, and geographical region from which reported. *J.Small Anim Pract.* 20, 1-11.
- Purohit A., Newman S. P., and Reed M. J. 2002. The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 4, 65-69.
- Qian Y. M., Song W. C., Cui H., Cole S. P., and Deeley R. G. 2001. Glutathione stimulates sulfated estrogen transport by multidrug resistance protein 1. *J.Biol.Chem.* 276, 6404-6411.
- Ravaglia G., Forti P., Maioli F., Boschi F., Bernardi M., Pratelli L., Pizzoferrato A., and Gasbarrini G. 1996. The relationship of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) to endocrine-metabolic parameters and functional status in the oldest-old. Results from an Italian study on healthy free-living over-ninety-year-olds. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 81, 1173-1178.
- Reed M. J., Purohit A., Woo L. W., Newman S. P., and Potter B. V. 2005. Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. *Endocr.Rev.* 26, 171-202.
- Remy-Martin A., Prost O., Nicollier M., Burnod J., and Adessi G. L. 1983. Estrone sulfate concentrations in plasma of normal individuals, postmenopausal women with breast cancer, and men with cirrhosis. *Clin.Chem.* 29, 86-89.
- Reuter S. and Mayer D. 1995. Transport of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate into rat hepatocytes. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 54, 227-235.
- Rheume E., Leblanc J. F., Lachance Y., Labrie F., and Simard J. 1991. Detection of frequent BglII polymorphism by polymerase chain reaction and TaqI restriction fragment length polymorphism for 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase at the human HSD beta 3 locus (1p11-p13). *Hum.Genet.* 87, 753-754.
- Roemer K. 1999. Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol.Chem.* 380, 879-887.
- Roodi N., Bailey L. R., Kao W. Y., Verrier C. S., Yee C. J., Dupont W. D., and Parl F. F. 1995. Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor-negative primary breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 87, 446-451.
- Root C., Smith C. D., Winegar D. A., Brieady L. E., and Lewis M. C. 1995. Inhibition of ileal sodium-dependent bile acid transport by 2164U90. *J.Lipid Res.* 36, 1106-1115.
- Ruder H. J., Loriaux L., and Lipsett M. B. 1972. Estrone sulfate: production rate and metabolism in man. *J.Clin.Invest* 51, 1020-1033.
- Rutteman G. R., Misdorp W., Blankenstein M. A., and van den Brom W. E. 1988. Oestrogen (ER) and progestin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *Br.J.Cancer* 58, 594-599.

- Saeki T., Takashima S., Sasaki H., Hanai N., and Salomon D. S. 1999. Localization of Estrone Sulfatase in Human Breast Carcinomas. *Breast Cancer* 6, 331-337.
- Saier M. H., Jr. 2000. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 64, 354-411.
- Santen R., Cavalieri E., Rogan E., Russo J., Guttenplan J., Ingle J., and Yue W. 2009. Estrogen mediation of breast tumor formation involves estrogen receptor-dependent, as well as independent, genotoxic effects. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1155, 132-140.
- Santen R. J., Boyd N. F., Chlebowski R. T., Cummings S., Cuzick J., Dowsett M., Easton D., Forbes J. F., Key T., Hankinson S. E., Howell A., and Ingle J. 2007. Critical assessment of new risk factors for breast cancer: considerations for development of an improved risk prediction model. *Endocr.Relat Cancer* 14, 169-187.
- Santner S. J., Feil P. D., and Santen R. J. 1984. In situ estrogen production via the estrone sulfatase pathway in breast tumors: relative importance versus the aromatase pathway. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 59, 29-33.
- Santner S. J., Leszczynski D., Wright C., Manni A., Feil P. D., and Santen R. J. 1986. Estrone sulfate: a potential source of estradiol in human breast cancer tissues. *Breast Cancer Res.Treat.* 7, 35-44.
- Sasano H., Frost A. R., Saitoh R., Harada N., Poutanen M., Vihko R., Bulun S. E., Silverberg S. G., and Nagura H. 1996. Aromatase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human breast carcinoma. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 81, 4042-4046.
- Sasano H., Suzuki T., Nakata T., and Moriya T. 2006. New development in intracrinology of breast carcinoma. *Breast Cancer* 13, 129-136.
- Satoh H., Yamashita F., Tsujimoto M., Murakami H., Koyabu N., Ohtani H., and Sawada Y. 2005. Citrus juices inhibit the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B. *Drug Metab Dispos.* 33, 518-523.
- Schmitt M., Klinga K., Schnarr B., Morfin R., and Mayer D. 2001. Dehydroepiandrosterone stimulates proliferation and gene expression in MCF-7 cells after conversion to estradiol. *Mol.Cell Endocrinol.* 173, 1-13.
- Schnabolk G. W., Youngblood G. L., and Sweet D. H. 2006. Transport of estrone sulfate by the novel organic anion transporter Oat6 (Slc22a20). *Am.J.Physiol Renal Physiol* 291, F314-F321.
- Schneider P. G., Jackisch C., and Brandt B. 1994. Endocrine management of breast cancer. *Int.J.Fertil.Menopausal Stud.* 39 Suppl 2, 115-127.
- Schroeder A., Eckhardt U., Stieger B., Tynes R., Schteingart C. D., Hofmann A. F., Meier P. J., and Hagenbuch B. 1998. Substrate specificity of the rat liver Na(+)-bile salt cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes and in CHO cells. *Am.J.Physiol* 274, G370-G375.
- Simard J. and Gingras S. 2001. Crucial role of cytokines in sex steroid formation in normal and tumoral tissues. *Mol.Cell Endocrinol.* 171, 25-40.
- Soule H. D., Vazquez J., Long A., Albert S., and Brennan M. 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J.Natl.Cancer Inst.* 51, 1409-1416.
- Spears K. J., Ross J., Stenhouse A., Ward C. J., Goh L. B., Wolf C. R., Morgan P., Ayrton A., and Friedberg T. H. 2005. Directional trans-epithelial transport of organic anions in porcine

- LLC-PK1 cells that co-express human OATP1B1 (OATP-C) and MRP2. *Biochem.Pharmacol.* 69 , 415-423.
- Speirs V., Green A. R., Walton D. S., Kerin M. J., Fox J. N., Carleton P. J., Desai S. B., and Atkin S. L. 1998. Short-term primary culture of epithelial cells derived from human breast tumours. *Br.J.Cancer* 78, 1421-1429.
- Stanway S. J., Purohit A., Woo L. W., Sufi S., Vigushin D., Ward R., Wilson R. H., Stanczyk F. Z., Dobbs N., Kulinskaya E., Elliott M., Potter B. V., Reed M. J., and Coombes R. C. 2006. Phase I study of STX 64 (667 Coumate) in breast cancer patients: the first study of a steroid sulfatase inhibitor. *Clin.Cancer Res.* 12 , 1585-1592.
- Suzuki T., Moriya T., Ishida T., Ohuchi N., and Sasano H. 2003-A. Intracrine mechanism of estrogen synthesis in breast cancer. *Biomed.Pharmacother.* 57, 460-462.
- Suzuki T., Onogawa T., Asano N., Mizutamari H., Mikkaichi T., Tanemoto M., Abe M., Satoh F., Unno M., Nunoki K., Suzuki M., Hishinuma T., Goto J., Shimosegawa T., Matsuno S., Ito S., and Abe T. 2003-B. Identification and characterization of novel rat and human gonad-specific organic anion transporters. *Mol.Endocrinol.* 17, 1203-1215.
- Suzuki T., Miki Y., Nakamura Y., Moriya T., Ito K., Ohuchi N., and Sasano H. 2005. Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr.Relat Cancer* 12, 701-720.
- Sweet D. H., Bush K. T., and Nigam S. K. 2001. The organic anion transporter family: from physiology to ontogeny and the clinic. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 281, F197-F205.
- Tamai I., Nezu J., Uchino H., Sai Y., Oku A., Shimane M., and Tsuji A. 2000. Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 273, 251-260.
- Tanaka H., Arakawa H., Yamaguchi T., Shiraishi K., Fukuda S., Matsui K., Takei Y., and Nakamura Y. 2000. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 404, 42-49.
- Thijssen J. H., van Landeghem A. A., and Poortman J. 1986. Uptake and concentration of steroid hormones in mammary tissues. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 464, 106-116.
- Tiberghien F. and Loo R. F. 1996. Ranking of P-glycoprotein substrates and inhibitors by a calcein-AM fluorometry screening assay. *Anticancer Drugs* 7, 568-578.
- Tsai M. J. and O'Malley B. W. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu.Rev.Biochem.* 63, 451-486.
- Ugele B., St Pierre M. V., Pihusch M., Bahn A., and Hantschmann P. 2003. Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 284, E390-E398.
- Utsumi T., Yoshimura N., Takeuchi S., Maruta M., Maeda K., and Harada N. 2000. Elevated steroid sulfatase expression in breast cancers. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 73, 141-145.
- Vogelstein B., Lane D., and Levine A. J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- Vousden K. H. 2002. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim.Biophys.Acta* 1602, 47-59.
- Woo L. W., Purohit A., Reed M. J., and Potter B. V. 1996. Active site directed inhibition of estrone sulfatase by nonsteroidal coumarin sulfamates. *J.Med.Chem.* 39, 1349-1351.

- Wu L., Einstein M., Geissler W. M., Chan H. K., Elliston K. O., and Andersson S. 1993. Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J.Biol.Chem.* 268, 12964-12969.
- Yalcin B., Buyukcelik A., Yalcin S., Utkan G., Doruk H., Dogan M., and Altan M. 2005. Re: Continuing outcomes relevant to Evista: breast cancer incidence in postmenopausal osteoporotic women in a randomized trial of raloxifene. *J.Natl.Cancer Inst.* 97, 542-543.
- Yamashita A., Maruo K., Suzuki K., Shiota K., Kobayashi K., and Hioki K. 2001. Experimental chemotherapy against canine mammary cancer xenograft in SCID mice and its prediction of clinical effect. *J.Vet.Med.Sci.* 63, 831-836.
- Yamashita S. 1998. Localization and functions of steroid hormone receptors. *Histol.Histopathol.* 13, 255-270.
- Zelcer N., Reid G., Wielinga P., Kuil A., van d. H., I, Schuetz J. D., and Borst P. 2003. Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). *Biochem.J.* 371, 361-367.
- Zhou F., Tanaka K., Soares M. J., and You G. 2003. Characterization of an organic anion transport system in a placental cell line. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 285, E1103-E1109.
- Zhou S., Schuetz J. D., Bunting K. D., Colapietro A. M., Sampath J., Morris J. J., Lagutina I., Grosveld G. C., Osawa M., Nakauchi H., and Sorrentino B. P. 2001. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat.Med.* 7, 1028-1034.
- Zhu K., Wang J., Zhu J., Jiang J., Shou J., and Chen X. 1999. p53 induces TAP1 and enhances the transport of MHC class I peptides. *Oncogene* 18, 7740-7747.

## 10 Anhang

### Genbankeintrag des SLC10A6 (SOAT) im National Center for Biotechnology Information unter Nr. NM\_197965:

Homo sapiens solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 6 (SLC10A6), mRNA

```

LOCUS       NM_197965                1502 bp     mRNA     linear     PRI 24-MAR-
2009
DEFINITION  Homo sapiens solute carrier family 10 (sodium/bile acid
cotransporter family), member 6 (SLC10A6), mRNA.
ACCESSION   NM_197965 XM_293769
VERSION     NM_197965.2  GI:225579058
KEYWORDS    .
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota;      Metazoa;      Chordata;      Craniata;      Vertebrata;
Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
            Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1 (bases 1 to 1502)
  AUTHORS   Geyer,J., Doring,B., Meerkamp,K., Ugele,B., Bakhiya,N.,
            Fernandes,C.F., Godoy,J.R., Glatt,H. and Petzinger,E.
  TITLE     Cloning and functional characterization of human sodium-
dependent
            organic anion transporter (SLC10A6)
  JOURNAL    J. Biol. Chem. 282 (27), 19728-19741 (2007)
  PUBMED    17491011
REFERENCE   2 (bases 1 to 1502)
  AUTHORS   Geyer,J., Wilke,T. and Petzinger,E.
  TITLE     The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid
            transporters regarding function and phylogenetic relationships
  JOURNAL    Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 372 (6), 413-431 (2006)
  PUBMED    16541252
REMARK      Review article
COMMENT     VALIDATED REFSEQ: This record has undergone validation or
            preliminary review. The reference sequence was derived from
            EF437223.1.
            On Mar 24, 2009 this sequence version replaced gi: 37537551.
PRIMARY     REFSEQ_SPAN              PRIMARY_IDENTIFIER PRIMARY_SPAN              COMP
            1-1502                    EF437223.1          1-1502
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..1502
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon: 9606"
                     /chromosome="4"
                     /map="4q21.3"
     gene             1..1502
                     /gene="SLC10A6"
                     /gene_synonym="MGC129575; MGC129576; SOAT"
                     /note="solute carrier family 10 (sodium/bile acid
cotransporter family), member 6"
                     /db_xref="GeneID: 345274"
                     /db_xref="HGNC: 30603"
                     /db_xref="HPRD: 11593"
     exon             1..525
                     /gene="SLC10A6"
                     /gene_synonym="MGC129575; MGC129576; SOAT"
                     /inference="alignment: Splign"

```

```

CDS
    /number=1
    149..1282
    /gene="SLC10A6"
    /gene_synonym="MGC129575; MGC129576; SOAT"
    /codon_start=1
    /product="sodium-dependent organic anion transporter"
    /protein_id=" NP_932069.1"
    /db_xref="GI:37537552"
    /db_xref="CCDS: CCDS3614.1"
    /db_xref="GeneID: 345274"
    /db_xref="HGNC: 30603"
    /db_xref="HPRD: 11593"

/translation="MRANCSSSSACPANSSEEEELPVGLEVHGNLELVFTTVSTVMMGL
LMFSLGCSVEIRKLWSHIRRPWGIAVGLLCQFGLMPFTAYLLAISFSLKPVQAI AVL I
MGCCPGGTISNIFTFWVDGMDLSISMTTCSTVAALGMMPLCIYLYTWSWSLQQNLTI
PYQNIGITLVCLTIPVAFGVYVNYRWPKQSKIILKIGAVVGGVLLLVA VAVAGVVLAKG
SWNSDITLLTISFIFPLIGHVTGFFLLALFTHQSWQRCRTISLETGAQNIQMCITMLQL
SFTAHLVQMLSFPPLAYGLFQLIDGFLIVAAYQTYKRRLKNKHGKKNSGCTEVCHTRK
STSSRETNAFLEVNEEGAITPGPPGPMDCHRALEPVGHITSCE"

STS
    149..1282
    /gene="SLC10A6"
    /gene_synonym="MGC129575; MGC129576; SOAT"
    /db_xref="UniSTS: 483033"

exon
    526..644
    /gene="SLC10A6"
    /gene_synonym="MGC129575; MGC129576; SOAT"
    /inference="alignment:Splign"

exon
    645..733
    /gene="SLC10A6"
    /gene_synonym="MGC129575; MGC129576; SOAT"
    /inference="alignment:Splign"

exon
    734..909
    /gene="SLC10A6"
    /gene_synonym="MGC129575; MGC129576; SOAT"
    /inference="alignment:Splign"

exon
    910..1067
    /gene="SLC10A6"
    /gene_synonym="MGC129575; MGC129576; SOAT"
    /inference="alignment:Splign"

exon
    1068..1502
    /gene="SLC10A6"
    /gene_synonym="MGC129575; MGC129576; SOAT"
    /inference="alignment:Splign"

ORIGIN
    1 ttaggatgaa tcaccttgct ggccaacagt tattggaatg attctccatg tgtgacttcg
    61 ttgcactatt acaaaatgtg gcaggataga cctgcccagc cattgttgcc gatgttcatt
    121 tgtaatgctg ccttaaggag atgaggagat gagagccaat tgttccagca gctcagcctg
    181 ccctgccaac agttcagagg aggagctgcc agtgggactg gaggtgcatg gaaacctgga
    241 gctcgttttc acagtgggtg ccactgtgat gatggggctg ctcatgttct ctttgggatg
    301 ttccgtggag atccggaagc tgtggtcgca catcaggaga ccctggggca ttgctgtggg
    361 actgctctgc cagtttgggc tcatgccttt tacagcttat ctctggcca ttagcttttc
    421 tctgaagcca gtccaagcta ttgctgttct catcatgggc tgctgcccgg ggggcaccat
    481 ctctaacatt ttcaccttct gggttgatgg agatatggat ctcagcatca gtatgacaac
    541 ctggttcacc gtggccgcc tgggaatgat gccactctgc atttatctct acacctggtc
    601 ctggagtctt cagcagaatc tcaccattcc ttatcagaac ataggaatta ccctgtgtg
    661 cctgaccatt cctgtggcct ttggtgtcta tgtgaattac agatggccaa aacaatccaa
    721 aatcattctc aagattgggg ccgttggttg tggggtcctc cttctggtgg tcgcagttgc

```

781 tgggtgtggtc ctggcgaaag gatccttgga ttcagacatc acccttctga ccatcagttt  
841 catctttcct ttgattggcc atgtcacggg ttttctgctg gcacttttta cccaccagtc  
901 ttggcaaagg tgcaggacaa tttccttaga aactggagct cagaatattc agatgtgcat  
961 caccatgctc cagttatctt tcaactgctga gcacttggtc cagatggtga gtttccact  
1021 ggccatgga ctcttcacgc tgatagatgg atttcttatt gttgcagcat atcagacgta  
1081 caagaggaga ttgaagaaca aacatggaaa aaagaactca ggttgcacag aagtctgcca  
1141 tacgaggaaa tcgacttctt ccagagagac caatgccttc ttggaggtga atgaagaagg  
1201 tgccatcact cctgggccac cagggccaat ggattgccac agggctctcg agccagttgg  
1261 ccacatcact tcatgtgaat agcagggact agctggctgg actggcccc ttctttttca  
1321 gtggccagta aagacagtgt gcagctgaca catgaatctt gttggtaggg ccagtgtgaa  
1381 tatttaagtg ttcaatgtta gaatatatat attttcatgt ggattgtgaa ttgtgatggg  
1441 atcacttttg gagattccca tttcaggag tttcttctgg gggtaacat aacgtatcaa  
1501 tg

## 11 Danksagungen

Im Folgenden möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die mich auf ganz unterschiedliche Art und Weise bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger für die Vergabe dieses Themas, die kritische Durchsicht der vorliegenden Dissertation, die ständige Unterstützung und Motivation.

Ich bedanke mich bei Herr Prof. Joachim Geyer für die Betreuung der theoretischen Arbeit, die zügige und kompetente Durchsicht des Manuskriptes zur Publikation der Daten und die Unterstützung meiner Doktorarbeit. Von seinem zahlreichen Ideenreichtum habe ich profitiert.

Von Anfang bis zum Ende dieser Arbeit wurde ich von Herr Dr. Daniel Zahner motiviert und unterstützt. Er war für mich sehr herzlich, wie ein großen Bruder, Freund und Kollege. Für seine unermüdliche Hilfe, Orientierung, die Betreuung der praktischen und vor allem der theoretischen Arbeit, die kritische Durchsicht der vorliegenden Dissertation, sowie die fachlich aufschlussreichen Gespräche und Orientierungshilfen, die ständige Unterstützung und Motivation, die Korrektur dieser Arbeit und die immer „offene Tür“ bedanke ich mich besonders ganz herzlich bei ihm. Ohne sein Wissen, ohne seine Ideen und seine Kritik wäre mein Forschungsprojekt niemals soweit gekommen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herr Prof Dr. Horst Zahner für die Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Dr. Jörg Alber danke ich für seine zeit- und ortsunabhängige Hilfe und auch sehr für die zusammen verbrachte Zeit und den Austausch, sowohl fachlich als auch fachfremd.

Den Kollegen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie Regina Leidolf und Anita Neubauer sowie Klaus Schuh, Kurt Stumpf und Christoph Zimmermann, danke ich für die Zusammenarbeit und technische Unterstützung.

Meinen wissenschaftlichen Kolleginnen und Kollegen Barbara Döring, Simone Burger, Garry Grosser, Hivda Ülbegi, Ebtisam Essid, Talah Kanbar, Marcela Moncada und Luise. C. Straehle danke ich freundschaftliche Arbeitsklima.

Frau von Schnakenburg möchte ich nicht nur für ihre Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten, sondern auch ihre ganz herzliche Motivation danken.



Ich danke auch allen anderen Mitarbeitern, die nicht namentlich genannt wurden, aber an der Entstehung dieser Arbeit mitgeholfen haben.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wären. Ich bedanke mich auch bei meinen Schwiegereltern und Familie Fidanci wegen Ihrer kontinuierliche Motivation und Unterschützung.

Am meistens möchte ich mich bei den Hauptleidtragenden, meiner Frau Tuğba und meiner Tochter (Aşkım) Ravza bedanken, für ihre unermüdliche Unterstützung, ihre Liebe und Motivation sowie für Ihre 5 Jahre dauernde Geduld. „Beklenen gün gelecekse, çekilen çile kutsaldır“.

Diese Arbeit wurde durch ein Graduiertenstipendium der Justus-Liebig-Universität Gießen unterstützt.

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5429-6

